

---

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Maier  
AG Molekulare und Experimentelle Pharmakologie  
Leitung: Prof. Dr. R. Nüsing

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort  
Marburg

# Studien zur Untersuchung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen und 8-epi-PGF<sub>2α</sub> als Marker für oxidativen Stress bei Typ 1 Diabetes

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Anemone Susanne Gerstner  
aus Stuttgart

Wiesbaden 2013

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 28.11.2013

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. R. Nüsing

Koreferent: Prof. Dr. A. Heufelder

---

# Inhaltsverzeichnis

## I. Einleitung

I.1. Grundlagen Diabetes mellitus.....	1
Epidemiologische Grundlagen.....	2
Typ 1 Diabetes.....	2
Typ 2 Diabetes.....	3
I.2. Tiermodelle des Typ 1 Diabetes.....	4
Streptozotizin.....	4
I.3. Entstehung von Diabetes mellitus durch oxidativen Stress.....	5
Hypothese für Glucosetoxizität auf die $\beta$ -Zellen und Entstehung eines Diabetes mellitus.....	5
Wirkung von ROS auf die Insulinproduktion.....	7
I.4. Methoden und Marker zur Messung von oxidativem Stress, u.a. MDA.....	8
I.5. Prostaglandine: Entstehung (Cyclooxygenase), Wirkung im Körper.....	8
Entstehung der Prostaglandine.....	9
Cyclooxygenase.....	9
Rezeptoren und Wirkung der Prostaglandine.....	10
I.6. Isoprostane: Bedeutung.....	11
Entstehung der Isoprostane.....	11
Vorkommen und Gewinnung der Isoprostane.....	13
Methoden zur Bestimmung der Isoprostane.....	13
Rezeptoren und Wirkung der Isoprostane.....	14
I.7. Vermuteter Mechanismus für die Entstehung der Spätfolgen des Diabetes mellitus.....	15
I.8. Antioxidantientherapie.....	16
I.9. Fragestellung.....	17

## II. Material

II.1. Klinischer Teil.....	18
Bestimmung von MDA aus EDTA-Blut.....	18
Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin.....	18
II.2. Tierexperimenteller Teil.....	18

---

Präparation der Mäuse.....	19
Fixation, Schneiden und Färben der Organpräparate.....	19
Bestimmung des Blutzuckers aus EDTA-Blut.....	19
 II. Methoden	
II.1. Klinischer Teil.....	20
Bestimmung von MDA aus EDTA-Blut.....	21
Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin (24h-Sammelurin).....	22
Bestimmung der Prostaglandine und Isoprostane im Urin (24 h-Sammelurin u. Spontanurin).....	23
Statistische Auswertung.....	23
II.2. Tierexperimenteller Teil.....	24
Behandlung der Mäuse mit Streptozotozin.....	25
Behandlung einer Mausgruppe mit SC236 (selektiver COX-2- Inhibitor).....	26
Behandlung einer Mausgruppe mit Tempol (Antioxidans).....	26
Präparation der Mäuse.....	27
Fixation, Schneiden und Färbung der Organpräparate.....	27
Bestimmung des Blutzuckers aus EDTA-Blut.....	28
Statistische Auswertung.....	28
 III. Ergebnisse	
III.1. Klinischer Teil.....	29
Darstellung der erhobenen Daten für die beiden Untersuchungs- gruppen.....	30
Vergleichende Darstellung von F <sub>2</sub> -Isoprostanen zu laborchemischen Parametern.....	31
Vergleichende Darstellung von F <sub>2</sub> -Isoprostanen zu Malondialdehyd.....	34
III.2. Tierexperimenteller Teil.....	36
Histologische Präparate des Pankreas im Vergleich.....	36
Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen – Diabetesinduktion mit einer Hochdosis Streptozotozin.....	37
Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen –	

Diabetesinduktion mit einer Niedrigdosis Streptozotozin .....	38
Untersuchungen an COX-1 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	39
Untersuchungen an COX-2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	40
Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die Versuchsreihen mit COX-2 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	42
Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen nach einmaliger Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG.....	44
Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Behandlung mit dem selektiven COX-2-Inhibitor SC236.....	45
Effekte des Antioxidans Tempol.....	48
Einfluss eines Typ 1 Diabetes auf MDA.....	49
 IV. Diskussion	
IV.1. Klinischer Teil.....	52
Erhöhung der Parameter für oxidativen Stress.....	52
Korrelation zu klinischen Parametern.....	53
Antioxidativer Status und antioxidative Therapie.....	54
IV.2. Tierexperimenteller Teil.....	55
Konzentrationsverlauf der F <sub>2</sub> -Isoprostane .....	55
Einfluss von COX-1 <sup>-/-</sup> auf das Studienmodell.....	56
Einfluss von COX-2 <sup>-/-</sup> auf das Studienmodell.....	56
Möglichkeit der COX-getriggerten Entstehung von 8-epi-PGF <sub>2α</sub> .....	59
Korrelation von F <sub>2</sub> -Isoprostanen zu MDA.....	59
Antioxidantientherapie.....	60
V. Zusammenfassung.....	62
VI. Literaturverzeichnis.....	64
 VII. Anhang	
VII.1. Akademische Lehrer.....	82
VII.2. Danksagung.....	82

---

## Abkürzungen:

AGE	-	advance glycosylation endproduct
BSA	-	Bovines Serumalbumin
cAMP	-	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX-1	-	Cyclooxygenase 1
COX-2	-	Cyclooxygenase 2
DDG	-	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
GAD 65	-	Glutamatdecarboxylase
HWZ	-	Halbwertszeit
HCl	-	Chlorwasserstoff (zusammen mit Wasser ergibt sich Salzsäure)
IA 2	-	Autoantikörper gegen die Tyrosinphosphatase
IDF	-	international diabetes federation
KG	-	Körpergewicht
MDA	-	Malondialdehyd
MHC	-	major histocompatibility complex
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	-	Paraformaldehyd
ROS	-	reactive oxygen species
SEM	-	Standardfehler des Mittelwertes
TNF <sub>α</sub>	-	Tumornekrosefaktor α
TP	-	Thromboxanrezeptor
WHO	-	world health organisation

## I. Einleitung

Diabetes mellitus ist eine sehr häufige Diagnose im Erwachsenen- aber auch bereits im Kindesalter. Die Anzahl der Erkrankten nimmt weltweit erheblich zu. Daher wurde insbesondere in den letzten Jahren intensive Forschung hinsichtlich der Entstehung und den zu erwartenden Spätkomplikationen des Diabetes mellitus betrieben. Oxidativer Stress soll hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

Im kommenden Teil der Arbeit werde ich auf die Ursache und die Folgen von oxidativem Stress, vor allem in Bezug auf den Diabetes mellitus, eingehen. Es werden die bestehenden Thesen für die Entstehung des Diabetes mellitus selbst und deren Spätkomplikationen durch (unter anderem) oxidativen Stress zusammengefasst. Als neue gute Marker für oxidativen Stress, hier im speziellen für die Lipidoxidation, gelten die  $F_2$ -Isoprostane. In diesem Rahmen werden Entstehung, Wirkung und Elimination der Prostaglandine und der  $F_2$ -Isoprostane, aufgezeigt. Im Anschluss werde ich entsprechend dem Entstehungsweg für oxidativen Stress mögliche Therapien diskutieren.

Ein Großteil meiner Untersuchungen erfolgt anhand von Tierversuchen. Daher wird auch auf die verschiedenen Tiermodelle zum Typ 1 Diabetes eingegangen.

Die Einleitung gibt einen kurzen Überblick und eine Zusammenfassung zu allen Themen, die diese Arbeit behandelt. Hervorzuheben sind folgende Diskussionspunkte: Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Diabetes mellitus, Entstehungsweg der Prostaglandine und Isoprostane und deren Korrelation zu klinischen Parametern, ein möglicher Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und den Spätkomplikationen des Diabetes mellitus und mögliche resultierende Therapiekonzepte.

### I.1. Grundlagen: Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die als Hauptmerkmal mit einer Hyperglycämie einhergeht. Ursachen, die hierzu führen, hängen immer mit Insulin, dem Regulationshormon des Blutzuckers, zusammen. Insulin vermittelt den Transport der Glucose ins Zellinnere. Es werden absoluter Insulinmangel, relativer Insulinmangel und abgeschwächte Wirkung des Insulins an den Zellen unterschieden.

Eine ursprünglich von der WHO publizierte Klassifikation wurde 1997 von der "American Diabetes Association" revidiert und von einer WHO-Expertengruppe bis auf minimale Änderungen 1998 übernommen. Seit 2009, und im Jahre 2011 in der Leitlinie bestätigt, werden die Diabetestypen nach der Leitlinie der DDG wie folgt unterteilt<sup>68</sup>. Man unterscheidet vier Formen der

Diabeteserkrankung. Hierzu zählen Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, als dritte Gruppe pharmakologisch verursachter oder im Rahmen einer anderen Erkrankung entstandener Diabetes und als vierte Gruppe Gestationsdiabetes. Im Folgenden werden die beiden wichtigsten Formen näher erläutert.

### Epidemiologische Grundlagen

Diabetes mellitus gewinnt unter anderem durch die demographische Alterung der Menschen und durch die zunehmende Adipositas in der Bevölkerung immer mehr an Bedeutung. Die Zahl der Diabetiker betrug im Jahr 2000 weltweit schätzungsweise 150 Millionen, diese Zahl wird sich bis 2025 schätzungsweise auf 300 Millionen verdoppeln<sup>136</sup>. Im Jahr 2006 gab es in Deutschland nach Angaben der WHO 8 Millionen Diabetiker, hiervon waren ca. 90% an Typ 2 Diabetes erkrankt<sup>26</sup>. Die Prävalenz im Jahr 2007 lag bei 8,9%<sup>27</sup>.

Besorgniserregend ist auch der dramatische Anstieg zuckererkrankter übergewichtiger Kinder. Bei Kindern ist vor allem der Typ 1 Diabetes von Bedeutung, wobei aufgrund der steigenden Anzahl der adipösen Kinder auch die Anzahl an Typ 2 Diabetes im Kindesalter zunimmt. Die IDF (International Diabetes Federation) schätzte für 2003 eine weltweite Prävalenz des Typ 1 Diabetes in der kindlichen Bevölkerung von 0,02%, das sind 430.000 der insgesamt 1,8 Milliarden Kinder<sup>27</sup>. Die Inzidenz im deutschen Sprachraum bei Kindern bis zum Alter von 14 Jahren lag im Jahr 2003 in Deutschland bei 12,2 Fällen pro 100.000 pro Jahr<sup>55</sup>. In Deutschland werden bereits 20% der Ausgaben der gesetzlichen Krankenkassen für die Behandlung des Diabetes und seiner Begleit-/ Folgeerkrankungen aufgewendet. Die Ausgaben für die Behandlungen beliefen sich 2005 auf 25 Milliarden Euro<sup>156</sup>.

### Typ 1 Diabetes

Der Typ 1 Diabetes ist die Form des Diabetes mellitus, die durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet ist. Es handelt sich hierbei um eine Autoimmunerkrankung, bei der das körpereigene Immunsystem im Rahmen einer Entzündungsreaktion die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört. Es werden hierfür verschiedene Ursachen diskutiert. Zum einen werden virale (v.a. Coxsackie B-Viren) Infektionen beschrieben, bei der die Lymphozyten des Patienten das fremde Protein (Virus) attackieren und vermutlich als Kollateralschaden die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstören<sup>127</sup>. Neben dieser Theorie gibt es weitere Hypothesen, die die Entstehung des Typ 1 Diabetes erklären sollen. Man geht davon aus, dass eine verkürzte Stillzeit das Risiko zu erkranken erhöht<sup>72</sup>, außerdem wird als auslösender Faktor die frühe Exposition gegenüber Gluten



diskutiert<sup>86</sup>. Es sind bisher mehr als 20 Gene identifiziert worden, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Typ 1 Diabetes stehen sollen. Als genetische Disposition gelten Veränderungen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, der sogenannten MHC-Region<sup>19</sup>. Zusammenfassend ist die Genese am ehesten multifaktoriell und polygenetisch. Marker für die Immundestruktion sind die Inselzellautoantikörper (ICAs), Insulinautoantikörper (IAAs), Autoantikörper gegen Glutamat-decarboxylase (GAD 65) und Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatasen (IA-2 und IA-2 $\beta$ ). Ein oder mehrere Autoantikörper sind zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation der Erkrankung bei 80% der Individuen nachweisbar. Der Typ 1 Diabetes manifestiert sich in den meisten Fällen vor dem 35. Lebensjahr, kann aber in allen Altersklassen auftreten. Der die  $\beta$ -Zellen zerstörende Vorgang vollzieht sich aber meist schon in der frühen Kindheit. Allerdings wird die Erkrankung erst ab einer Zerstörung von 80-90% der  $\beta$ -Zellen klinisch manifest und geht mit dem vollständigen Fehlen von Insulin einher, welches für die Aufnahme von Glucose in die Zellen und in die Leber, welche als Speicherorgan dient, wichtig ist. Klinische Symptome der Erstmanifestation sind vor allem ein deutlicher Wasser- und Nährstoffverlust, eine Übersäuerung des Blutes und eine Gewichtsabnahme. Man spricht hier von einer Ketoazidose. Es bedarf bei allen Patienten der Substitution von Insulin<sup>18</sup>.

Kinder erkranken bis dato häufiger an Typ 1 Diabetes als an Typ 2 Diabetes, allerdings kann sich dies in den kommenden Jahren bei zunehmender Adipositas der Kinder ändern. Die klinischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an Kindern mit einem Typ 1 Diabetes durchgeführt.

## Typ 2 Diabetes

Im Rahmen eines Typ 2 Diabetes kommt es zu einer Störung, bei der Insulin zwar vorhanden ist, an seinem Zielort, den Rezeptoren in den Zellmembranen, aber nicht richtig wirken kann. Man spricht daher von einer Insulinresistenz. Es gibt hierfür zwei Ausprägungen. Zum einen gibt es Patienten mit einer starken peripheren Insulinresistenz und einem relativen Insulinmangel, zum anderen solche mit einer milden peripheren Insulinresistenz und einem schweren Insulinsekretionsdefekt. Das Glucosetransporterprotein Typ 4 (GLUT 4) ist bei praktisch allen Patienten intakt, allerdings ist es an den Zielzellen herabreguliert. Eine hohe Menge an Insulin führt normalerweise zu einem gesteigerten Einbau des GLUT 4 in die Zellmembran und somit zu einem gesteigerten Glucosetransport durch die Zellmembran von Muskel- und Fettzellen<sup>18</sup>. Dies ist allerdings bei Diabetikern nicht mehr der Fall, so dass das vorhandene Insulin nicht mehr ausreichend wirken kann. Neben der peripheren Insulinresistenz spielt auch der hepatische Glucoseumsatz bezüglich der Hyperglycämie der Typ 2 Diabetiker eine wichtige Rolle. Insbesondere unter Fastenbedingungen kommt es zu einer überschießenden hepatischen Glucoseproduktion (Gluconeogenese), die weder durch die meist bestehende Hyperinsulinämie, noch durch die schon be-

stehende Hyperglycämie unterdrückt wird, wie dies beim Stoffwechselgesunden normalerweise der Fall ist. Die Insulinresistenz manifestiert sich also als verminderte Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel, als gesteigerte Lipolyse und als gesteigerte Gluconeogenese. Beim Typ 2 Diabetiker ist das Insulinsekretionsmuster auf vielfältige Art und Weise gestört<sup>18</sup>.

In den ersten Jahren manifestiert sich die Erkrankung nicht, da die  $\beta$ -Zellen durch eine vermehrte Produktion von Insulin die periphere Resistenz kompensieren können. Erst wenn die produzierte Insulinmenge hierfür nicht mehr ausreicht, manifestiert sich der Typ 2 Diabetes. Am Ende der Erkrankung steht immer der Defekt der  $\beta$ -Zellen mit erhöhter Apoptoserate. Ursächliche Faktoren des Typ 2 Diabetes stellen die Adipositas, sowie eine genetische Disposition und andere Umweltfaktoren dar<sup>18</sup>. Die Patienten werden vorerst mit diätetischen Maßnahmen und mittels Antidiabetika und letztlich durch Insulinsubstitution therapiert.

## I.2. Tiermodelle des Typ 1 Diabetes

Um den Typ 1 Diabetes zu untersuchen, stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Die wohl gängigste ist die Induktion des Diabetes mittels diabetogener Pharmaka, wie z.B. Streptozotozin<sup>80</sup>. In der letzten Zeit hat mit dem Fortschritt in der Gentechnik der Einsatz transgener Tiere zugenommen<sup>65</sup>. Besondere Bedeutung haben hierbei Tiere, die menschliche Gene tragen, da man annimmt, dass die Ergebnisse der Untersuchungen hierdurch annähernd auf den Menschen übertragbar sind. Hierbei führt die genetische Veranlagung zu einer spontanen Entwicklung des Krankheitsbildes. Eine große Bedeutung kommt im Weiteren Inzuchtstämmen mit einer hohen Prävalenz für das Auftreten eines Diabetes mellitus zu. Die bekanntesten Tiermodelle sind die NOD-Maus<sup>85</sup> und die Wistar-BB-Ratte<sup>107</sup>. Es handelt sich hierbei um gerne verwendete Tiermodelle, da der auftretende Typ 1 Diabetes dem menschlichen Typ 1 Diabetes sehr ähnlich ist. Gemeinsam sind hier homologe genetische Defekte zellulärer Autoimmunität gegen die gleichen Autoantigene wie z.B. GAD 65<sup>66</sup>, IA2<sup>105</sup> und Insulin<sup>154</sup>.

### Streptozotozin

Streptozotozin gehört zu der Substanzklasse der Glucosamine und Methylnitrosoharnstoffe. Es handelt sich hierbei um eine natürlich vorkommende chemische Verbindung, die spezi-

fisch toxisch für die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Zellen des Pankreas ist. Die selektive Wirkung auf die  $\beta$ -Zellen beruht darauf, dass Streptozotocin aufgrund der Glucosestruktur durch den Glucosetransporter GLUT2, der in hoher Dichte in der Membran der  $\beta$ -Zellen vorkommt, in das Zellinnere transportiert wird. In der Zelle erfolgt eine Spaltung zwischen Glucoseanteil und dem Methylnitrosoharnstoff, der für die folgende DNA-schädigende Wirkung verantwortlich ist<sup>143</sup>. Im Folgenden kommt es dann zur Apoptose der Langerhansschen Zellen und zur konsekutiven Ausbildung eines Diabetes mellitus. Streptozotocin wird im Rahmen von Tierstudien, zur Induktion eines Diabetes mellitus und in der Therapie von nicht-operablen Insulinomen eingesetzt.

### I.3. Entstehung von Diabetes mellitus durch oxidativen Stress

Die im folgenden beschriebene schädigende Wirkung der Hyperglycämie auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas gilt für alle Diabetesformen, allerdings ist sie für den Typ 2 Diabetes als insofern relevanter anzusehen, da diese Patienten über einen längeren Zeitraum eine Restfunktion der  $\beta$ -Zellen aufweisen. Beim Diabetes mellitus tritt mit dem zunehmenden Verlust der  $\beta$ -Zellen eine chronische Hyperglycämie auf. Obwohl Glucose unter physiologischen Bedingungen den stärksten Stimulator für die Insulinsekretion darstellt, kommt es unter chronischer Hyperglycämie zur  $\beta$ -Zell-Dysfunktion und zum  $\beta$ -Zell-Untergang<sup>126,150</sup>, statt zu einer Hyperplasie der Zellen.

Zusammenfassend konnte hinsichtlich des Diabetes mellitus in einer Reihe von Untersuchungen eine toxische Wirkung von Glucose auf das Pankreas selbst<sup>43</sup> und weitere Strukturen, wie z.B. die Gefäße, beobachtet werden. Den dafür zugrunde liegenden biochemischen Mechanismus hatte man aber lange Zeit nicht verstanden. Kürzlich wurde oxidativer Stress dann als Ursache ausfindig gemacht<sup>126,150</sup>. Oxidativer Stress scheint nicht nur an der Entstehung des Diabetes mellitus, sondern auch an einer Vielzahl anderer Erkrankungen beteiligt zu sein. Zu nennen sind Arteriosklerose<sup>11,142</sup>, Hypercholesterinämie<sup>158</sup>, Neurodegenerative Erkrankungen<sup>1</sup>, Alzheimer<sup>88</sup>, Zystische Fibrose<sup>155</sup>, Rheumatoide Arthritis<sup>157</sup> und einige mehr.

#### Hypothesen für die Glucosetoxizität auf $\beta$ -Zellen und Entstehung eines Diabetes mellitus

Im Rahmen einer Hyperglycämie muss zunehmend vorhandene Glucose mittels alternativer Wege abgebaut werden. Neben schon früher beschriebenen Mechanismen, wie zum Beispiel dem Abbau von Glucose über den Sorbitolweg<sup>147</sup>, sind die beiden im folgenden beschriebenen Mechanismen für diese Arbeit von Bedeutung. Sie scheinen die schädigende Wirkung von Glu-

cose auf die  $\beta$ -Zellen zu erklären.

1. Chronische Hyperglycämie führt zu Glycosilierung verschiedener Proteine und Lipide im Körper, vor allem kommt es durch die Millard-Reaktion zur Glycosilierung von Hämoglobin, Albumin und Linsenkristallen. Es entstehen hierbei über eine Schiff-Base das Amadori-Produkt, AGE (advance glycosylation end product) und als Nebenprodukt ROS (reactive oxygen species = Reaktive Sauerstoffspezies). ROS kann durch ihre hohe Reaktionsfreudigkeit zu einer Gewebeschädigung führen.<sup>7,54,127,129</sup>
2. Anaerobe Glycolyse, Glucoseautooxidation<sup>97,114</sup> und die Reduktion von Zucker führt zudem zur vermehrten Bildung von ROS.

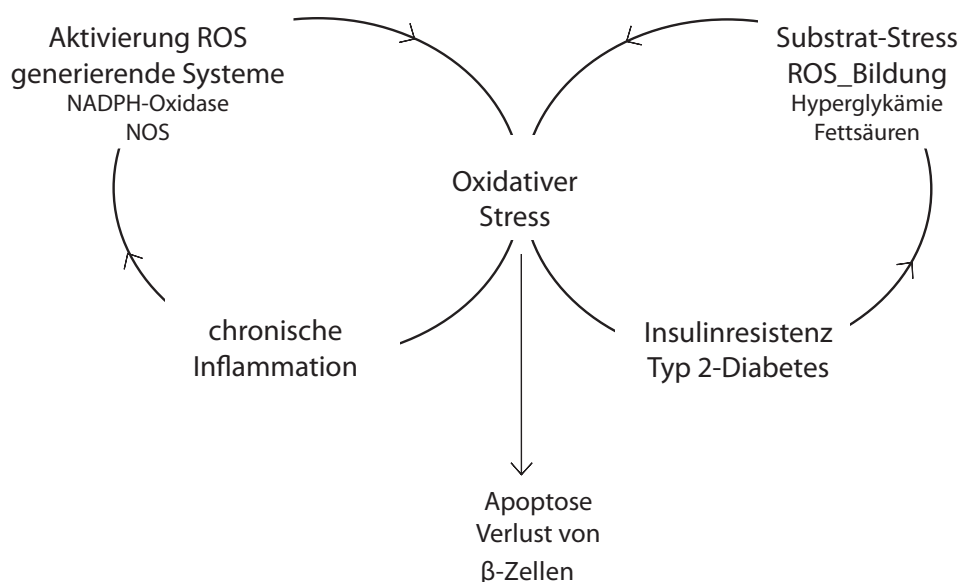


Fig.1. ROS-vermittelter Untergang von  $\beta$ -Zellen

Durch die initial in den Mitochondrien gebildete ROS werden weitere ROS-bildende Systeme aktiviert, so dass ein Netzwerk von Interaktionen und ein sich selbst verstärkender Kreislauf entsteht. Zusätzlich zu den Mitochondrien tragen die aktivierte NADPH-Oxidase, die entkoppelte Stickstoffmonoxid-Synthase und möglicherweise weitere Faktoren zur Bildung von ROS bei. Insulinresistenz verstärkt die ROS-Bildung über eine Vergrößerung des Substratangebotes (Hyperglycämie, Fettsäuren)<sup>132</sup>.

Zu der Gruppe der ROS zählen Superoxid, Hydrogenperoxid, Nitritoxid und Hydroxylradikale. Alle initiieren im Körper durch ihre hohe Reaktivität und Instabilität eine Kettenreaktion, in der sie sich ihr fehlendes Elektron dadurch aneignen, dass sie benachbarte Moleküle attackieren und verändern. Unter all diesen ist das Hydroxylradikal am gefährlichsten, da es schnell über die Zellmembran ins Zellinnere gelangen kann. Im Zellkern können Hydroxylradikale mit der DNA reagieren und auf diese Weise mutagen und schädigend wirken. Die Bildung von ROS ist per se

physiologisch; sie reguliert die Gesundheit, indem sie einen Modulator für die Phagozytose und somit für die Bekämpfung von Bakterien darstellt. Nur bei einem Ungleichgewicht führt ROS zu Gewebeschäden<sup>128</sup>. Kommt es zu einer Überladung an ROS, bei unzureichendem Vorhandensein kompensatorischer Mechanismen, spricht man von oxidativem Stress<sup>18</sup>.

Beim Diabetes mellitus konnte unter dem Einfluss von ROS bei chronischer Hyperglycämie eine verminderte Lebensdauer und ein vermindertes Zellwachstum der  $\beta$ -Zellen festgestellt werden<sup>92</sup>. Zugrunde liegt dieser Beobachtung eine Veränderung der, die Apoptose beeinflussenden, Gene. Das Antiapoptogen (Bcl-2) ist in seiner Aktivität unverändert, wohingegen die proapoptotischen Gene (Bad, Bid, Bik) überexprimiert sind<sup>127</sup>.

### Wirkung von ROS auf die Insulinproduktion

ROS scheint zudem einen entscheidenden Einfluss auf die verminderte Produktion von Insulin zu haben. Unter dem Einfluss von oxidativem Stress konnte eine verminderte Aktivität des Insulin-Promotor-Gens beobachtet werden. Hierdurch kann die Transkription des Insulingens nicht gestartet werden. Es kommt zur verminderten Bildung von Insulin-mRNA und folglich zur verminderten Produktion von Insulin<sup>128</sup>. In diesem Zusammenhang ist zudem eine verminderte DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren PDX-1, MafA (RIPE-3b1), IPF1 und STF-1 beobachtet worden. Sie haben wie die Promotoren selbst einen entscheidenden Einfluss auf die Transkription des Insulingens. Die Transkriptionsfaktoren reagieren sehr sensibel auf oxidativen Stress, so dass ein Zusammenhang zwischen Hyperglycämie, ROS und der verminderten Insulinproduktion gesehen wird<sup>114,139</sup>.

Bestätigen lässt sich die Vermutung dadurch, dass in einem Versuch durch Matsuoka et al.<sup>91</sup> die verminderte Bildung der Insulin-mRNA durch Zugabe von Antioxidantien verhindert werden konnte. Die Veränderung in der Insulinproduktion konnte in Verbindung mit der Dauer der Glucoseexposition gebracht werden. Hierfür führte man Untersuchungen an HIT-15-Zellen mit hohen Konzentrationen an Glucose durch. Bei akuter hyperglycämischer Belastung kam es zum Anstieg, bei chronischer hyperglycämischer Belastung zum Abfall der Insulinproduktion<sup>113</sup>.

Die schädigende Wirkung freier Radikale auf das Pankreasgewebe stellt somit ein schwerwiegendes Problem dar, da das Pankreas im Vergleich zu allen anderen Geweben die geringste Menge an Antioxidantien besitzt und so dem schädigenden Einfluss kaum entgegenwirken kann<sup>78</sup>.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei der schädigenden Wirkung durch Hyperglycämie möglicherweise um irreversible Veränderungen im Zellinneren handelt. Betroffen sind

vor allem die  $\beta$ -Zellen und Komponenten, die an der Insulinproduktion (Promotorgene, Transkriptionfaktoren) beteiligt sind. Als Hauptursache hierfür wird ROS angesehen.

#### I.4. Methoden und Marker zur Messung von oxidativem Stress, u.a. MDA

Freie Radikale werden schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts als Schlüsselfaktoren für oxidativen Stress diskutiert. Hauptangriffspunkt sind Lipide, Proteine und DNA<sup>47,94</sup>. Da die Halbwertszeit der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) normalerweise sehr kurz ist, sind spezielle Techniken von besonderer Wichtigkeit, um das Ausmaß der produzierten ROS und den damit verbundenen oxidativen Stress in vivo zu messen. Vor allem die Messung der Endprodukte, die bei der Reaktion mit den Makromolekülen des Körpers durch ROS entstanden sind, stellt im klinischen Alltag eine nützliche Methode dar.

Man spricht bei einer durch Radikale vermittelten Oxidation und Abspaltung von Lipiden aus der Zellmembran von Lipidoxidation. Zur Messung der Lipidoxidation gibt es gut untersuchte Parameter, wie z.B. das Malondialdehyd (MDA). Nach seiner Bildung durch die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus den Zellmembranen, kann es dann im Blut in freier Form oder an Aminosäurereste gebunden vorliegen. Malondialdehyd beeinflusst nach seiner Entstehung verschiedene intrazelluläre Signalwege<sup>91</sup>, auf welche hier nicht näher eingegangen wird. Allerdings konnte kürzlich beobachtet werden, dass Bestandteile der Nahrung die Werte des Parameters verändern<sup>13,30</sup>. Dies vermindert seine Brauchbarkeit als zuverlässigen, unabhängigen Marker. Zudem wird MDA als Spaltprodukt in einem Verhältnis von 1:1 bei der Bildung von Thromboxan  $A_2$  in Thrombozyten gebildet<sup>53</sup>, so dass es auch über diesen Weg zu einer Beeinflussung des Parameters kommt und die Zuverlässigkeit in Hinblick auf oxidativen Stress angezweifelt werden muss.

Im Vergleich hierzu scheinen die kürzlich entdeckten  $F_2$ -Isoprostane ein zuverlässiger, spezifischer und sensibler Marker in vivo und in vitro zu sein. Aus der Studie 'Biomarkers of Oxidative Stress Study (BOSS)' wurde gefolgert, dass  $F_2$ -Isoprostane die zuverlässigsten Marker für oxidativen Stress in vivo im Vergleich zu allen bereits bekannten Biomarkern darstellen<sup>62,94</sup>.

#### I.5. Prostaglandine – Entstehung (Cyclooxygenase), Wirkung im Körper

Bei den Prostaglandinen handelt es sich um eine Gruppe von Gewebshormonen, welche alle aus der Arachidonsäure mittels der Cyclooxygenase gebildet werden. Abhängig von ihrer Bindung

an verschiedene Rezeptoren entfalten die Prostaglandine ganz unterschiedliche Wirkungen im menschlichen Körper. Als sogenannte Gewebshormone wirken sie meist autokrin oder parakrin.

### Entstehung der Prostaglandine

Die Bildung von Prostaglandinen erfolgt aus der Arachidonsäure, einer vierfach ungesättigten Fettsäure. Auch drei- und fünffach ungesättigte Fettsäuren können bei ihrer Entstehung eine Rolle spielen, für den Menschen allerdings scheinen sie unwichtig zu sein. Wir nehmen die Arachidonsäure entweder mit der Nahrung auf oder sie wird in unseren Zellen aus der essentiellen Fettsäure Linolsäure aufgebaut. Die Arachidonsäure wird wie andere Fettsäuren in Form von Phospholipiden in die Zellmembran eingebaut. Erst nach Spaltung dieser Phospholipide durch die Phospholipase  $A_2$ , steht die Arachidonsäure als Substrat für die Bildung von Prostanoiden (Prostaglandine, Thromboxan  $A_2$ , Prostacyclin) zur Verfügung. Die Bildung der Prostanoiden erfolgt vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum enzymvermittelt über die Cyclooxygenase. Dieses Enzym besitzt sowohl Cyclooxygenase-, als auch Peroxidaseaktivität. Aus der Arachidonsäure wird mittels der Cyclooxygenase  $PGG_2$  gebildet. Daraus wiederum erfolgt die Bildung von  $PGH_2$  mittels der Peroxidase. Es handelt sich bei beiden Substanzen um zyklisch angeordnete Endoperoxide. Aus  $PGH_2$ , welches als Muttersubstrat fungiert, werden letztlich die Prostaglandine ( $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$ ), Prostacyclin ( $PGI_2$ ), sowie Thromboxan ( $TXA_2$ ) durch verschiedene Reduktasen und Isomerasen gebildet<sup>11</sup>.

### Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist ein membrangebundenes Häm-/ Glycoprotein. Es sind zwei Isoformen der Cyclooxygenase bekannt; zum einen die Cyclooxygenase-1 (COX-1), zum anderen die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die erst zehn Jahre später etwa zeitgleich von zwei unterschiedlichen Forschergruppen entdeckt wurde<sup>74,140</sup>. Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer Struktur, in ihrem Genlokus, kommen in verschiedenen Zelltypen vor und werden unterschiedlich reguliert.

Man geht davon aus, dass COX-1 vor allem bei physiologischen Vorgängen eine Rolle spielt, wohingegen die Expression von COX-2 hauptsächlich bei pathologischen Veränderungen im Rahmen von Entzündungsreaktionen erhöht ist.

COX-1 wird von allen Zellen exprimiert und ist ständig aktiv. Ihre Hauptwirkung entfalten die hierüber gebildeten Prostaglandine v.a. im Gastrointestinaltrakt und den Nieren. Im Magen und Dünndarm erhöhen sie die Schleimproduktion und vermindern die Sekretion von HCl. Sie sind daher mitverantwortlich für den Schleimhautschutz. In den Nieren fördern sie die Durchblutung

und erhöhen die Reninsekretion<sup>82</sup>.

COX-2 unterliegt dagegen einer vielfältigen Regulation. Als allgemeine Regel gilt, dass seine Aktivität durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 und TNF $\alpha$  induziert wird. Bevorzugte Zellen, die mit COX-2 ausgestattet sind, sind die Makrophagen des Immunsystems. Die hier entstehenden Prostaglandine wirken hauptsächlich im Rahmen von Entzündungen, Schmerzsensibilisierung und Temperaturerhöhung<sup>82</sup>.

### Rezeptoren und Wirkung der Prostaglandine

Prostaglandine entwickeln ihre Wirkung über die verschiedenen Prostaglandinrezeptoren (genannt TP, EP<sub>1-4</sub>,...). Es handelt sich hierbei um Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Sie führen je nach Typ zu einer Stimulation oder Hemmung der Adenylatcyclase mit entsprechender Veränderung der cAMP-Konzentration oder beeinflussen die zelluläre Calciumkonzentrationen über den Phosphatidylinositol-Zyklus (IP<sub>3</sub>)<sup>82</sup>. Ihre Wirkung (Fig.2.) ist daher überaus verschieden. Prostaglandine kommen im gesamten menschlichen Organismus vor.

Prostaglandin	Wichtige biologische Aktivität
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Broncho- und Vasodilatation Hemmung der HCl-Sekretion im Magen, Antilipolyse im Fettgewebe, Erzeugung von Fieber, Entzündungsreaktion, Entzündungsschmerz, Aktivierung von Osteoklasten
Prostaglandin D <sub>2</sub>	Bronchokonstriktion, Schlaferzeugung
Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Broncho- und Vasokonstriktion Konstriktion der glatten Muskulatur
Thromboxan A <sub>2</sub>	Broncho- und Vasokonstriktion Plättchenaggregation
Prostaglandin I <sub>2</sub> (Prostacyclin)	Vasodilatation, Zunahme der Gefäßpermeabilität, Hemmung der Plättchenaggregation, Entzündungsreaktion

Fig.2. Wirkungen der verschiedenen Prostaglandine<sup>82</sup>.

Auch scheinen die Prostaglandine einen Einfluss auf die  $\beta$ -Zell-Funktion zu haben, ob dies allerdings einen Einfluss auf die Pathogenese des Diabetes mellitus hat, ist ungeklärt<sup>84</sup>.



## I.6. Isoprostane – Bedeutung

Isoprostane sind eine komplexe Gruppe, welche durch die Reaktion von freien Radikalen mit der Arachidonsäure entstehen. 1990 konnte erstmals von Morrow et al.<sup>100</sup> gezeigt werden, dass F<sub>2</sub>-Isoprostane auch beim Menschen gebildet werden. Die bis heute am besten untersuchten Isoprostane sind die F<sub>2</sub>-Isoprostane, und im speziellen das 8-epi-PGF<sub>2α</sub>. Seit ihrer Entdeckung werden die Isoprostane vermehrt als klinischer Parameter für die Lipidoxidation bei verschiedenen Krankheiten untersucht und eingesetzt. Es wird angenommen, dass sie den zuverlässigsten Marker für oxidativen Stress darstellen<sup>62,94,105</sup>.

### Entstehung der Isoprostane

F<sub>2</sub>-Isoprostane werden in situ aus veresterter Arachidonsäure durch den Angriff freier Radikale gebildet (Fig.3)<sup>101</sup>. Das heißt, dass sie an die Zellmembran gebunden entstehen, aber um aktiv zu werden, erst von ihr abgespalten werden müssen. Es kann allerdings auch freie Arachidonsäure radikalisch in Isoprostane umgewandelt werden. Initial entstehen drei verschiedene Isoprostanuntergruppen, F<sub>2</sub>-, D<sub>2</sub>- und E<sub>2</sub>-Isoprostane. Diese Verbindungen können anschließend vollständig reduziert werden. Hierbei kommt es zur Bildung von vier F<sub>2</sub>-Regioisomeren: 5-, 8-, 12-, 15-Isoprostane. Zudem kann es zu einem Rearrangement und zur Bildung der anderen beiden Isoprostane D<sub>2</sub> und E<sub>2</sub> kommen. Sobald die Isoprostane aus den Zellmembranen gelöst sind, zirkulieren sie frei im Plasma. Sie werden schlussendlich renal eliminiert<sup>99</sup>.

Die Bildung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> kann, anderen Publikationen nach, hingegen enzymatisch über die Cyclooxygenase verlaufen<sup>137,138</sup>. Bei der Entstehung sollen beide Isoenzyme, COX-1 und COX-2, beteiligt sein<sup>121</sup>. Dieser These liegen folgende Beobachtungen zugrunde:

Durch die Induktion der Cyclooxygenase COX-2 in Monozyten durch verschiedenste Stimuli konnte eine erhöhte Exkretionsrate an 8-epi-PGF<sub>2α</sub> beobachtet werden. Monozyten werden im Rahmen von Lipidoxidation und oxidativem Stress aktiviert<sup>120</sup>. Daher kann man mutmaßen, dass die Produktion des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> an einen entzündlichen Prozess gekoppelt, beziehungsweise dieses im Rahmen von oxidativem Stress entstanden ist. Zudem entstehen Isoprostane COX-2-abhängig in glatter Muskulatur<sup>60</sup> und COX-1-abhängig in Thrombozyten<sup>119,121</sup>. Es konnte in einer weiteren Untersuchung gezeigt werden, dass die Produktion von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> durch Aspirin® und gleichwertige NSAR, welche die Cyclooxygenase hemmen, verhindert werden konnte<sup>121</sup>. Allerdings zeigte sich in einer anderen Studie, dass der in vitro beobachtete Weg über die Cyclooxygenase in vivo vernachlässigbar ist<sup>21</sup>. Hierbei ist vor allem von Interesse, dass die unabhängig von COX entstandenen Isoprostane im Vergleich zu den COX-abhängigen Isoprostanen

in Urin und Plasma von gesunden Menschen bis zu zehnfach höher sind. Das erklärt zumindest teilweise die verschwindend geringe Bedeutung von COX bei der Entstehung der Isoprostane<sup>110</sup>.

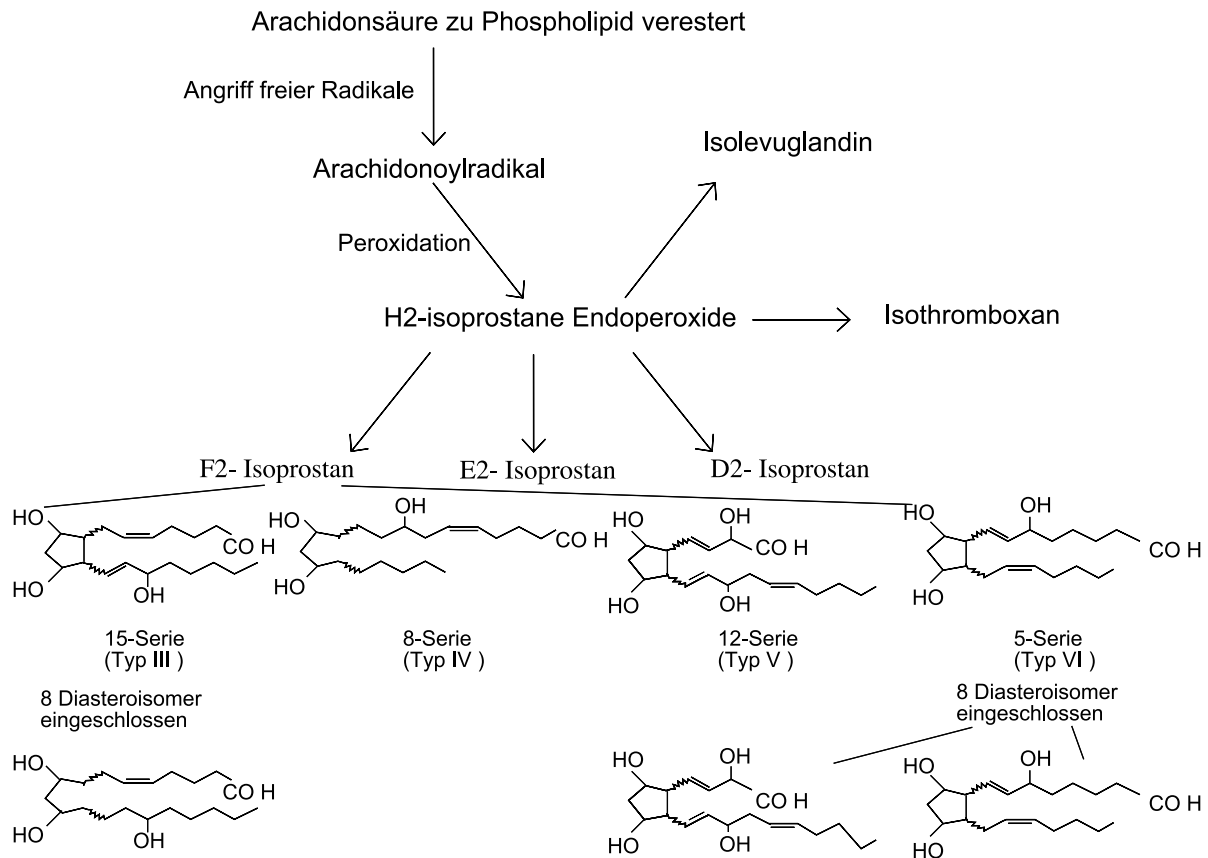


Fig.3. Entstehung der Isoprostane aus der Arachidonsäure auf einem durch Radikale vermittelten Weg. Durch die Attacke der freien Radikale auf die Arachidonsäure entstehen Arachidonoyl-Radikale, welche durch Peroxidation vier  $\text{PGH}_2$  bilden, welche darauf voll zu  $\text{PGF}_2$  reduziert oder zu  $\text{PGE}_2$  beziehungsweise  $\text{PGD}_2$  umgebildet werden<sup>21</sup>.

## Vorkommen und Gewinnung der Isoprostane

Isoprostane sind in allen menschlichen Körperflüssigkeiten vorhanden, allerdings ist ihre Konzentration im Urin vierzig mal höher als im Plasma. Sie haben eine kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Ein großer Vorteil für die Messung der Isoprostane im Urin ist, dass ihre Bildung ex vivo sogar bei Raumtemperatur über 10 Tage nicht beobachtet werden konnte und somit die ursprüngliche Konzentration nach Abnahme der Probe unverändert bleibt<sup>119</sup>. Im Gegensatz hierzu kommt es bei Blutproben zu einer Autooxidation, die durch Zugabe von Konservierungsstoffen, wie BHT (= Butylated Hydroxytoluene) oder Superoxid-Dismutase, vermieden werden muss. Eine andere Methode um die Autooxidation in Blutproben zu verhindern, ist, diese sofort in flüssigem Stickstoff schockzugefrieren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufzubewahren<sup>111</sup>. Dasselbe gilt auch für Gewebeproben.

Für die Messung der Isoprostane in einem Spontanurin bei Gesunden konnte keine tageszeitliche Schwankung festgestellt werden<sup>125,155</sup>, so dass diese Probe repräsentativ für jeden Zeitpunkt am Tag scheint. Leider kann eine Einzelbestimmung während eines entzündlichen Prozesses oder einer oxidativen Schädigung keine ausreichende Aussage über die Produktion von 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  liefern. Daher ist es in diesem Fall von Nöten, mehrere Bestimmungen im Laufe eines Tages zu machen, um einen schnellen Anstieg oder Abfall des Parameters feststellen zu können<sup>50</sup>. Auch die Messung der Isoprostane aus 24-Stunden-Urinen könnte hier möglicherweise Vorteile haben. Günstig ist zudem, dass es sich bei der Bestimmung von Isoprostanen aus Urin um ein nicht-invasives Untersuchungsverfahren handelt.

## Methoden zur Bestimmung der Isoprostane

Für die Bestimmung der Isoprostane wurden mehrere Methoden beschrieben. Einige beruhen auf Flüssigkeitschromatographie<sup>149</sup> und Gaschromatographie<sup>119,131,138</sup>, andere auf immunologischen Methoden<sup>5,103</sup>. Es zeigte sich, dass mit einer Kombination aus Gaschromatographie und einer Dünnschichtchromatographie (=GC-MS) auch kleine Mengen des zu untersuchenden Parameters gemessen werden können. Man kann diese Kombination daher als zuverlässige Methode zum Auffinden und Quantifizieren von Isoprostanen einsetzen. Der Nachteil dieser Methode liegt in seiner Kosten- und Zeitintensität. Im klinischen Alltag werden daher bevorzugt Radioimmunoassays angewendet. Die verwendeten Antikörper sind allerdings nicht auf Kreuzreaktionen mit den anderen F<sub>2</sub>-Isoprostanen und deren Metaboliten getestet worden. Es zeigten sich bei Vergleichsmessungen zwischen den Radioimmunoassays und der Bestimmung mittels GC-MS deutliche Unterschiede<sup>21</sup>. Daher kann man bei der Messung mittels Radioimmunoassay nur von einer semi-quantitativen Bestimmung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen sprechen<sup>21</sup>.

## Rezeptoren und Wirkungen der Isoprostane

Kürzlich erschienene Daten<sup>31,37,60,83</sup> weisen stark darauf hin, dass Isoprostane biologisch aktiv sind und ihre Wirkung über die Aktivierung des Thromboxan-Rezeptors (TP), aber auch über andere Prostaglandinrezeptoren<sup>31,37</sup> vermitteln. In einer Veröffentlichung wird die Möglichkeit der Existenz eines unabhängigen, dem Thromboxan-Rezeptor ähnlichen, Isoprostanrezeptor diskutiert<sup>38</sup>. Dies ist aber rein spekulativ und wird beispielsweise von Sametz et al. nicht unterstützt<sup>134</sup>.

Das am intensivsten untersuchte Isoprostan 8-epi-PGF<sub>2α</sub> hat neben seiner Funktion als Marker auch eine biologische Aktivität. 8-epi-PGF<sub>2α</sub> ist stark renal vasokonstriktiv<sup>102</sup>, die Folge ist ein verminderter renaler Blutfluss und eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate<sup>100</sup>. Im Weiteren ist eine vasokonstriktive Aktivität auf intracerebrale<sup>51</sup> und retinale<sup>76</sup>, sowie auf weitere nicht näher angegebene Gefäße beschrieben. In den wenigen Daten bezüglich seiner Wirkung auf das Nervensystem wird vermutet, dass 8-epi-PGF<sub>2α</sub> die Anzahl der Nozizeptoren vergrößert und die sympathische Neurotransmission stimuliert. Seine Wirkung entfaltet 8-epi-PGF<sub>2α</sub> über den Thromboxan-Rezeptor als voller oder partieller Agonist<sup>20</sup>. Isoprostane wirken zudem bronchokonstriktiv<sup>4,60,64</sup>.

Im Vergleich hierzu wirken die E<sub>2</sub>-Isoprostane nicht nur über den TP-Rezeptor, sondern auch über die EP-Rezeptoren. In den meisten Studien zeigen sich die E<sub>2</sub>-Isoprostane im Vergleich zu den F<sub>2</sub>-Isoprostanen potenter in ihrer biologischen Aktivität<sup>20,60</sup>. Trotzdem werden zur Quantifizierung von Lipidoxidation bei oxidativem Stress die F<sub>2</sub>-Isoprostane herangezogen, da bei einer unzureichenden Datenlage für E<sub>2</sub>-Isoprostane keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen pathologischen Vorgängen im Körper und einer physiologisch vermehrten Produktion gemacht werden konnte. Über physiologische Veränderungen und Wirkung der Isoprostane liegen derzeit noch keine Untersuchungen vor<sup>6</sup>. Man kann nur sagen, dass es bei pathologischen Veränderungen zu einem starken lokalen Anstieg der Isoprostane kommt, nachdem sie durch die Phospholipase aus der Zellmembran freigesetzt wurden.

## I.7. Vermuteter Mechanismus für die Entstehung der Spätfolgen des Diabetes mellitus

Bei allen Arten des Diabetes mellitus kommt es zu einer mangelhaften Aufnahme von Glucose in die Zellen, entweder durch das Fehlen von Insulin oder einer Resistenz der notwendigen Rezeptoren. Es kommt zu einer Hyperglycämie. Diese konnte in der Studie, Diabetes Control and Complication Trial<sup>146</sup> als wichtigster unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von Spätfolgen

beschrieben und von der ,United Kingdom Prospective Diabetes Study'<sup>148</sup> bestätigt werden. Für die Entstehung und Progression von diabetischen Folgeschäden ist vor allem die Dauer und der Grad der Hyperglycämie von Bedeutung. Die Komplikationen unterteilt man in makrovaskuläre (z.B. Arteriosklerose mit konsekutiv erhöhter Rate an Herzinfarkt und Schlaganfall) und mikrovaskuläre (z.B. Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie) Komplikationen, sowie Veränderungen des autonomen Nervensystems. Man geht davon aus, dass diese Komplikationen wie folgt entstehen:

Durch die Hyperglycämie kommt es neben Ablagerungen von Zucker an den Gefäßwänden, auch zu Einlagerungen in verschiedenen Organen. Allein dieser Vorgang ist Grund für eine Beeinträchtigung der physiologischen Funktion der betroffenen Organe. Zum anderen führt das Vorliegen von großen Mengen an Glucose verstärkt zu oxidativem Stress<sup>9</sup>. Freie Hydroxylradikale führen durch eine hohe Reaktionsrate zur Schädigung von Lipiden und DNA.

Hierbei spielen folgende Faktoren eine Rolle<sup>59</sup>:

- Sorbit-Akkumulation (=Pylolweg) mit Verschiebung des NADH/NADPH-Gleichgewichts<sup>52</sup>
- Steigerung der de-novo-Synthese von Diacylglycerol und Aktivierung der Proteinkinase C<sup>56</sup>
- Nichtenzymatische Glycosilierung von Struktur-, Membran- und Transportproteinen (AGE = Advanced Glycosylation Endproducts)<sup>152</sup>; hierbei kommt es zur Akkumulation von AGE und Glycosilierungsprodukten in langlebigen Proteinen (Kollagen, Linsen und Nervenstränge)
- Makrophagenaktivierung mit Steigerung von IL-1, TNF- $\alpha$  und Endothelinsekretion<sup>8,40</sup>
- Steigerung der Glycooxidierung und des oxidativen Stresses und eine hiermit einhergehende Steigerung der oxidierten Lipoproteine (LDL)<sup>89,116</sup>

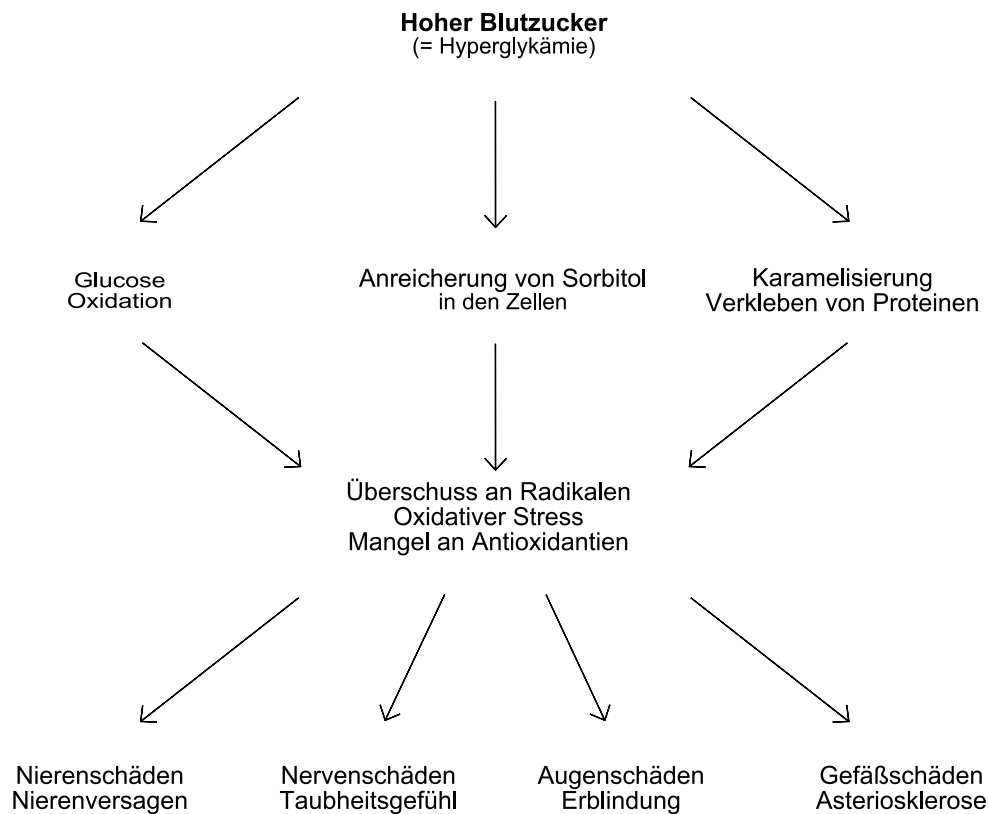


Fig.4: Oxidativer Stress und diabetische Spätfolgen (diabetes-news.de)

## I.8. Antioxidantientherapie

Oxidativer Stress scheint demnach einen Risikofaktor für die Entwicklung von Spätkomplikationen des Diabetes mellitus darzustellen<sup>7,40</sup>. In den letzten Jahren wurde daher vor allem das Augenmerk auf die etwaige Therapieoption mit Antioxidantien gerichtet, insbesondere mit den Vitaminen C und E.

In einer Untersuchung kam es unter einer Therapie mit Vitamin E bei Typ 2 Diabetikern zu einer Abnahme der Produktion von F<sub>2</sub>-Isoprostanen. Diese Abnahme konnte auch bei anderen Erkrankungen, die mit oxidativem Stress einhergehen, beobachtet werden<sup>21</sup>. Auch für Vitamin C konnte in der Monotherapie oder in Kombination mit Vitamin E oder NAC (N-Acyl-L-Cystein) ein positiver Einfluss auf die Reduktion von oxidativem Stress gezeigt werden<sup>63,147</sup>. Die Ergebnisse konnten in einer kürzlich durchgeführten Studie mit Raloxifen®, einem Vitamin E-ähnlichen Antioxidans, bestätigt werden<sup>17</sup>. Erklärt werden konnte diese Beobachtung durch eine Hypothese von Patrignani et al.<sup>115</sup>. Diese besagt, dass der Effekt von Vitamin E durch ein Abfangen der freien Radikale zustande kommt und mit zunehmender Lipidoxidation steigt. Diese Beobachtungen werden durch die CHAOS-Studie unterstützt, welche einen klinischen Benefit durch die Therapie mit Vitamin E zeigt<sup>93</sup>.

Allerdings liegen auch mehrere Studien vor, die keinen positiven Effekt von Antioxidantien auf oxidativen Stress zeigten. Dako et al.<sup>22</sup> konnte zum Beispiel nach einer 3-wöchigen Behandlung von Typ 2 Diabetikern keine positive Auswirkung von Vitamin C auf oxidativen Stress beobachten. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die HOPE-Studie, welche keinen positiven Effekt durch die Therapie mit Vitamin E zeigt<sup>93</sup>.

Zusammenfassend ist daher der klinische Benefit einer Antioxidantientherapie bei Diabetikern noch unklar.

## I.9. Fragestellung

Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung, die durch steigende Patientenzahlen immer mehr an Bedeutung gewinnt. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine präventiven Strategien, so dass es von großer Relevanz ist, die Therapie der Erkrankung und ihrer Komplikationen zu verbessern. Hierfür ist das Wissen um ihre Entstehung und damit verbundener Parameter von Bedeutung. Zum jetzigen Zeitpunkt wird freien Radikalen, und dem damit verbundenen oxidativen Stress, eine wichtige Rolle zugeschrieben. Als neuer Marker für die Lipidoxidation werden die F<sub>2</sub>-Isoprostane diskutiert.

Da es bezüglich der aufgeworfenen Thematik kaum Studien gibt, soll in meiner Arbeit untersucht werden, ob sich die Konzentration der F<sub>2</sub>-Isoprostane bei Kindern mit Diabetes mellitus, von der bei gesunden Kindern unterscheidet. Vergleichend hierzu soll dieselbe Fragestellung am Tiermodell untersucht werden. Im Weiteren soll der Frage nachgegangen werden, ob sich die Konzentration der F<sub>2</sub>-Isoprostane als zuverlässiger Marker für die Lipidoxidation und hiermit auch für oxidativen Stress im Vergleich zu dem herkömmlichen Marker (MDA) herausstellt. Aufgearbeitet werden soll diesbezüglich auch, ob die F<sub>2</sub>-Isoprostane mit aktuellen Blutzuckerwerten, HbA<sub>1c</sub> oder weiteren klinischen Parametern korrelieren.

Außerdem wird im Tiermodell auf die Entstehung der Isoprostane eingegangen. Unter diesem Gesichtspunkt soll untersucht werden, inwieweit ihre Entstehung mit dem Enzym Cyclooxygenase oder freien Radikalen in Verbindung steht. Ergänzend werden Versuche unter der Gabe von Antioxidantien durchgeführt. Ziel dieser ist es, zu überprüfen, ob es zu einer Reduktion der F<sub>2</sub>-Isoprostane kommt und sich somit Antioxidantien durch Verminderung der Folgeschäden von oxidativem Stress als mögliche Therapieergänzung eignen.

## II. Material und Methoden

### Erster Teil: Material

#### II.1. Klinischer Teil

##### Bestimmung von MDA (Malondialdehyd) aus EDTA-Blut

Lipid Peroxidation Assay Kits.....Calbiochem® (Cat. No. 437634)  
 Spektralphotometer - Wellenlänge 586nm.....\*)  
 Wasserbad bei 45° C.....\*)  
 Konzentrierte HCl.....\*)

##### Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin ( 24-Stunden-Sammelurine)

Mikroprotein-PR<sup>TM</sup>.....Sigma Diagnostics® (Methode-Nr.611)  
 Bovines Serum Albumin (BSA).....\*)  
 PBS-Puffer.....\*)  
 Spektralphotometer - Wellenlänge 600nm.....\*)  
 Schüttler.....\*)

#### II. 2. Tierexperimenteller Teil

C57Bl6 Mäuse.....Charles River Lab. Inc. Wilmington,  
 MA, USA  
 COX-2<sup>-/-</sup> -Mäuse (Zuchtmaus).....Prof. Robert Langenbach, Research  
 Triangle Park, North Carolina, USA  
 COX-1<sup>-/-</sup> -Mäuse (Zuchtmaus).....Prof. Robert Langenbach, Research  
 Triangle Park, North Carolina, USA  
 Altromin Standard Diät 1320 (Mäuse).....Altromin Gesellschaft für  
 Tierernährung GmbH, Lage  
 Forene® (Isofluran).....Abbot, Wiesbaden  
 Ketavet® (Ketaminhydrochlorid) 100 mg/ml.....Pharmacia, Erlangen  
 Rompun® (Xylazinhydrochlorid) 2 %ig.....Bayer Vital, Leverkusen



Streptozotozin.....	Sigma Diagnostics®
Natriumcitrat.....	*)
Konzentrierte HCl.....	*)
SC236.....	Sigma Diagnostics®
DMSO.....	*)
Tempol (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl).....	Fluka®

#### Präparation der Mäuse

PFA (Paraformaldehyd).....	4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS
Carnoy.....	Gemisch aus 6 Teilen 100 % Ethanol + 3 Teilen Chloroform + 1 Teil konzentrierte Essigsäure
Flüssiger Stickstoff.....	*)

#### Fixation, Schneiden und Färben der Organpräparate

Ethanol 50 %.....	*)
Ethanol 70 %.....	*)
Ethanol 90 %.....	*)
Ethanol 95 %.....	*)
Ethanol 100 %.....	*)
Methanol.....	*)
Xylol.....	*)
Hematoxylin.....	*)
Eosin.....	*)
Gewebewachs.....	Paraplast, Tyco Healthcare, Mansfield, USA

#### Bestimmung des Blutzuckers aus EDTA-Blut

Reflotron Glukose Messgerät.....	Roche Diagnostics GmbH, Germany
----------------------------------	---------------------------------

\*) Alle nicht weiter beschriebenen Chemikalien wurden bei den gängigen Unternehmen wie Sigma Diagnostics® und Calbiochem® bestellt und nach den entsprechenden Vorschriften verwendet. Bei den aufgeführten Geräten handelt es sich um Standardlaborgeräte.

## II. Material und Methoden

### Zweiter Teil: Methoden

#### II. 1. Klinischer Teil

In die klinische Studie wurden 38 Kinder mit Typ 1 Diabetes aus der Tagesklinik der Kinderklinik der Philipps-Universität Marburg aufgenommen. Die Kinder und deren Eltern wurden über die Untersuchungen aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg genehmigte die Durchführung der Studie.

Die Dauer des Typ 1 Diabetes lag zwischen 1 und 14 Jahren (Mittlere Dauer: 3 Jahre). Es waren 12 Patienten weiblich und 26 männlich. 5 Patienten zeigten eine Mikroalbuminurie. Bei 3 Patienten bestand zudem eine Zöliakie. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lag bei allen Kindern keine akute Infektion vor. Aufgrund der gezeigten Korrelation zwischen Rauchen und oxidativem Stress wurde anamnestisch eine Nikotinabusus ausgeschlossen<sup>14</sup>. Zudem wurden Kinder mit vorangegangenen Operationen und Niereninsuffizienz ausgeschlossen. Alle Patienten wurden entsprechend ihrer Erkrankung ernährt und erhielten eine intensivisierte Insulintherapie mit einem langwirksamen und einem kurzwirksamen Insulin. Die Anzahl der internationalen Einheiten wurde für jedes Kind an den jeweiligen Verbrauch angepasst. Die Konzentration des Serumkreatinins war für alle Patienten im Normbereich ( $0,625 \pm 0,267$  mg/dl (MD $\pm$ SEM)).

Untersucht wurden im Rahmen der jährlichen Kontrolluntersuchungen eine Probe des mitgebrachten 24h-Urins, Spontanurin und 2ml EDTA-Blut der Patienten. Hieraus wurden folgende Parameter bestimmt: MDA im Blut, Proteine und Prostaglandine, sowie Isoprostane im Urin. Erhoben wurden des Weiteren klinische Daten, wie Dauer des Diabetes mellitus, Therapieart, Körpergröße, Gewicht, Blutdruck systolisch und diastolisch und der Puls.

Aus dem Blut wurden zusätzlich der aktuelle Blutzucker, HbA<sub>1c</sub> und Kreatinin bestimmt; aus dem Urin Zucker, Ketone, Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin,  $\alpha_2$ -Makroglobuline, Immunglobulin G und das Gesamtprotein. Diese Parameter geben zum einen die Güte der Blutzuckereinstellung wieder und zeigen zum anderen eine Nierenschädigung beim Diabetes mellitus an.

Die Bestimmung dieser laborchemischen Parameter erfolgte im Zentrallabor der Philipps-Universität Marburg.

## Bestimmung von MDA (Malondialdehyd) aus EDTA-Blut

Die Bestimmung von MDA, einem Marker für Lipidoxidation, erfolgte mittels des Lipid Peroxidation Assay Kits (Cat. No. 437634 von Calbiochem®). Malondialdehyd ist ein Endprodukt der Lipidoxidation, welches durch die Peroxidation aus ungesättigten Fettsäuren entsteht.

### 1. Herstellung des Reagenzes

Vor jeder Messung musste dieses Reagenz neu zubereitet werden. Hierfür wurde 1 Volumenanteil (500 µl) Eisenionen in 3 Volumenanteilen (1500 µl) Methanol zu der von Calbiochem® vorgefertigten Lösung R1 (N-methyl-2-phenylindol in Acetonitril) gegeben. Hieraus entstand die Lösung R1\*.

### 2. Herstellung der Standardlösung

Die mitgelieferte konzentrierte (10 mM) MDA – Standardlösung (1,1,3,3-Tetramethoxypropan in Tris-HCl) musste, bevor man die Bestimmung begonnen hat, mit destilliertem Wasser 1:500 verdünnt werden.

### 3. Herstellung der Proben

162 µl R1\*  
 + 50 µl Probe (Plasma) / Standard  
 + 38 µl 12N HCl = konzentrierte HCl  
 =250 µl Proben-/Standard-Lösung

Der Ansatz wurde dann bei 45° C für 60 min inkubiert und die dadurch initiierte Reaktion auf Eis gestoppt.

### 4. Bestimmung der Absorption

Zur Bestimmung der Absorption wurden die Standardlösung und die Proben nach folgendem Schema auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipetiert und bei einer Wellenlänge von 586 nm mit einem Spektralphotometer gemessen.

Standard	H2O	Konzentration (Graph)	Konzentration
50	0	1	20 µM
37.5	12.5	0.75	15 µM
25	25	0.5	10 µM
12.5	37.5	0.25	5 µM
6.25	43.75	0.125	2.5 µM
3.1	46.9	0.062	1.25 µM
1.6	48.4	0.032	0.625 µM
0	50	0	0 µM

## 5. Berechnung der Konzentration

Unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms Prism® 4.0 wurden für die jeweiligen Bestimmungen Standardkurven erstellt. Zur genauen Berechnung der Probenwerte wurde eine lineare Regressionsgerade zu jeder Standardkurve ermittelt. Da die Absorptionen zu den Konzentrationen direkt proportional sind, konnte eine Berechnung der Konzentrationen für die Proben mittels dieser Regressionsgeraden erfolgen.

### Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin (24 Stunden-Sammelurin):

Die Bestimmung der Proteinmenge im Urin erfolgte mittels Mikroprotein-PR™ (Sigma Diagnostics® (Methode-Nr.611)). Das Sigma-Mikroprotein-PR-Verfahren ist eine Methode, die auf der Bindung eines Farbstoffes beruht. Es tritt hierbei eine Verschiebung der Absorption auf, wenn der Pyrogallol-Red-Molybdat-Komplex basische Aminosäuregruppen der Proteinmoleküle bindet. Die Zunahme der Absorption bei 600 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Probe (modifiziertes Verfahren)<sup>36</sup>.

#### 1. Herstellung von Standardlösungen

Als Proteinstandard wurde 33 mg bovines Serumalbumin (BSA) mit 1,65 ml PBS in Lösung gebracht. Hieraus entstand eine Albuminlösung mit der Konzentration von 20 mg/ml. Diese Stammlösung wurde zum Erstellen von Standardlösungen mit verschiedener Konzentration mit PBS weiter verdünnt.

#### 2. Bestimmung der Absorptionen

Zur Bestimmung der Absorption wurden die Standards und die zu bestimmenden Proben in einer Menge von jeweils 5 µl zusammen mit 200 µl der mitgelieferten Mikroproteinlösung nach folgenden Schemata auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipetiert. Um die Messgenauigkeit zu erhöhen, wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt und später in der Auswertung dann ein Mittelwert berechnet.

96-well-Mikrotiterplatte (die angegebenen Zahlen entsprechen der Verdünnungsreihe in mg BSA/ml):

	1	2	3	...
A	MQ-H <sub>2</sub> O	0.625	0.1563	
B	MQ-H <sub>2</sub> O	0.625	0.1563	
C	1.85	0.4625	0.1156	
D	1.85	0.4625	0.1156	
E	1.25	0.3125	0.0781	
F	1.25	0.3125	0.0781	
G	0.925	0.2313	Probe 1	
H	0.925	0.2313	Probe 1	

Die Mikrotiterplatte wurde, nachdem sie nach dem beschriebenen Schema befüllt wurde, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und für eine weitere Minute auf einem Schüttler gemischt, bevor die Proben dann bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels eines Spektralphotometers gemessen wurden.

### 3. Berechnung der Konzentration

Unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms Prism® 4.0 wurden für die jeweiligen Bestimmungen Standardkurven erstellt. Zur genauen Berechnung der Probenwerte wurde eine lineare Regressionsgerade zu jeder Standardkurve ermittelt. Da die Absorptionen zu den Konzentrationen direkt proportional sind, konnte eine Berechnung der Konzentrationen für die Proben mittels dieser Regressionsgerade erfolgen.

### Bestimmung der Prostaglandine und Isoprostane im Urin (24 Stunden-Sammelurin und Spontanurin)

Die Bestimmung der Prostaglandine und Isoprostane erfolgte durch das Prostaglandinlabor, Universitätsklinikum Marburg. Die Methode beruht auf einer Kombination aus Gaschromatographie mit einer Dünnschichtchromatographie (GC-MS)<sup>137</sup>. Folgende Parameter wurden aus dem Urin gemessen: F<sub>2</sub>-Isoprostane, 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGE-M, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>, 11,12-dihydro-TXB<sub>2</sub>. Die Bestimmung erfolgte freundlicherweise durch Herrn B. Watzer und Herrn Dr. H. Schweer.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism® 4.0. Hierbei wurde bei vergleichenden Untersuchungen zwischen zwei Gruppen der t-Test, bei mehreren Untersuchungs-

gruppen der 1-way-Anova-Test mit Bonferroni als post-Test-Verfahren verwendet. Um eine Signifikanz der Untersuchungen festzustellen, bestimmten wir  $p$ . Zur Auswertung von Korrelationskurven verwendeten wir den Parameter  $r^2$  und  $p$ , um eine signifikante Korrelation festzustellen. In den Tabellen ist der Mittelwert (S.E.M.) angegeben.

## II. 2. Tierexperimenteller Teil

Für den tierexperimentellen Teil der Studie wurden verschiedene Mauslinien benutzt. Zuchtmäuse (COX-1<sup>-/-</sup> und COX-2<sup>-/-</sup>) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Robert Langenbach, Research Triangle Park, North Carolina, USA zur Verfügung gestellt. Die in den Versuchen verwendeten Tiere stammten aus der eigenen Zucht. Beide Mauslinien wurden noch ca. 10 Mal mit C57Bl6 rückgekreuzt. Daher wurden C57Bl6-Wildtypmäuse als Kontrollgruppe verwendet.

Die Durchführung der Versuchsreihen wurde vom Regierungspräsidium Gießen (Ordnungsnummer 12/04) bewilligt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter den vorgeschriebenen Bedingungen. Sie erhielten Standardfutter (Altromin Standard-Diät 1320) und Wasser ad libitum. In den Räumen lag ein 12 h Tag-/Nachtrhythmus und eine Temperatur von 23° C vor.

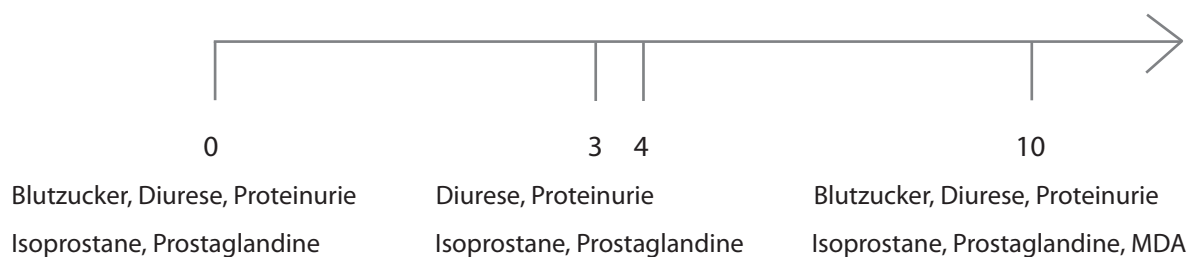
In der tierexperimentellen Studie wurden 14 Versuchsreihen mit jeweils 3-6 Mäusen durchgeführt. Zur Untersuchung verschiedener Hypothesen und Überlegungen wurden folgende Versuchsanordnungen gewählt:

- 3 Hochdosisversuche (einmalig 200 mg Streptozotolin/kg KG i.p.) mit Wildtypmäusen (C57Bl6)
- 2 Niedrigdosisversuche (an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 40 mg Streptozotolin/kg KG i.p.) mit Wildtypmäusen (C57Bl6)
- 2 Hochdosisversuche mit COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen
- 4 Versuche mit COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen (1\*Hochdosisversuch (in diesem Fall: 125 mg Streptozotolin/kg KG), 3\*Verdünnungsreihen)
- 1 Versuch mit einer Dosis von 125 mg Streptozotolin/kg KG einmalig i.p. bei Wildtypmäusen (C57Bl6)
- 1 Hochdosisversuch mit Wildtypmäusen (C57Bl6) unter Gabe von SC236 (selektiver COX-2-Inhibitor)
- 2 Hochdosisversuche mit Wildtypmäusen (C57Bl6) unter Gabe von Tempol (Antioxidans)

Zu Beginn der Versuche waren die Tiere circa 8 Wochen alt. Die Versuche dauerten jeweils 10 Tage. Die Untersuchungen erfolgten in speziell angefertigten Stoffwechselkäfigen, um den 24h-Urin ge-

winnen zu können.

Zunächst erfolgte die Durchführung eines Kontrolltags unter Erhebung der Ausgangswerte für Gewicht, Trinkmenge, Blutzucker, sowie Proteine, Prostaglandinwerte und Isoprostane im 24h-Urin für jede Maus. Das Blut wurde aus der Schwanzvene der Tiere gewonnen. Die Untersuchungen begannen, nachdem die Induktion eines Typ 1 Diabetes mittels Streptozotozin erfolgte. Als Zeitpunkt wurde der Tag 0 festgelegt. Hierbei wurden zwei verschiedene Ansätze unterschieden: 1. Hochdosisgabe: 200 mg Streptozotozin/kg KG, bzw. bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen 125 mg Streptozotozin/kg KG einmalig i.p.; 2. Niedrigdosisgabe: 40 mg Streptozotozin/kg KG i.p. an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Schon am dritten Tag konnte ein Anstieg des Blutzuckerwertes bei einem Pilotversuch festgestellt werden. Daher wurde für die darauf folgenden Untersuchungen nur noch der Basisblutzuckerwert und der Blutzuckerendwert bestimmt. An den Tagen 3, 4 und 10 wurden nun jeweils 24h-Urine gewonnen, sowie das Gewicht und die Trinkmenge der Tiere gemessen. Am Tag 10 wurden die Tiere präpariert und Blut durch Herzpunktion zur Bestimmung des aktuellen Blutzuckerwerts und des Malondialdehyds (MDA) gewonnen. Ferner wurden die Organe für histologische Untersuchungen entnommen.



### Behandlung der Mäuse mit Streptozotozin

Streptozotozin ist ein Derivat des D-Glucosamins. Es wirkt als selektives Toxin und zerstört spezifisch die insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Hieraus resultiert ein Typ 1 Diabetes.

-> Hochdosisgabe:

Das Streptozotozin wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Zubereitung wogen wir auf einer Feinwaage der gewünschten Konzentration entsprechende Portionen ab und lagerten diese dann bis zum Gebrauch wieder bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aufgrund des schnellen Zerfalls der gelösten Substanz sollte die Injektion innerhalb von 10 min nach Ansetzen der Lösung (Streptozotozin + Na-Citratpuffer) erfolgen. Das Streptozotozin ist vor allem unter sauren Bedingungen stabil und zerfällt bei neutralen pH-Werten.

Nur ein kleiner Teil des injizierten Streptozotozin wird in vivo wirksam, der Rest zerfällt unter normalen Konditionen im Körper und wird abgebaut<sup>75</sup>. Die Applikation erfolgte intraperitoneal (i.p.) mit einer Dosis von 200 mg/kg KG<sup>45,81</sup> (bei den COX-2<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer Dosis von 125 mg/kg KG), was einer Menge von 2,5 µl/kg KG entspricht. An den Tagen der Applikation wurden die Mäuse gewogen, um eine gewichtsadaptierte Dosis an Streptozotozin verabreichen zu können.

Für den Ansatz des Natrium-Citratpuffers wurden 14,7 g Natrium-Citrat in 1 Liter Reinstwasser gelöst. Hierbei entstand eine 50 mM Lösung. Der pH-Wert wurde durch Titration mit HCl eingestellt. Der End-pH sollte 4,5 betragen. Für die Injektionslösung wurden dann 4 mg (2,5 mg) Streptozotozin in 50 µl Natrium-Citratpuffer gelöst.

-> Niedrigdosisgabe:

Bei der Niedrigdosisversuchsreihe erfolgt die Streptozotozingabe wie folgt:

Es wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit jeweils eine Konzentration von 40 mg/kg KG/d intraperitoneal appliziert<sup>45,81</sup>. Die Durchführung erfolgte entsprechend der oben angegebenen Vorgehensweise.

#### Behandlung einer Mausgruppe mit SC236 (selektiver COX-2-Inhibitor)

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss der fehlenden COX-2-Aktivität im Hinblick auf die erhobenen Ergebnisse untersucht werden. Hierzu wurde 10 mg des COX-2-selektiven Inhibitors SC236 in 1 ml DMSO gelöst und den Tieren (C57Bl6–Wildtyp) in der Menge von 1 µl/kg KG (entspricht 10 mg/kg KG) schon 3 Tage vor Beginn und über die gesamte Zeitdauer des Versuchs täglich einmal i.p. appliziert<sup>10,44</sup>. Hierdurch werden 90% der COX-2-Aktivität geblockt<sup>107</sup>.

#### Behandlung einer Mausgruppe mit Tempol (Antioxidans)

Um den Effekt von Antioxidantien auf die Produktion und Ausscheidung von Isoprostanen zu untersuchen, führten wir eine weitere Versuchsreihe unter Gabe des Radikalfängers Tempol (Calbiochem®) durch<sup>3,39,79</sup>. Das Medikament wurde vor und während des gesamten Versuchs in einer Konzentration von 1 mM über die Tränke verabreicht. Das bedeutet 500 mg Tempol auf 1 Liter Wasser. Der Angebot an Flüssigkeit wurde während der polydipsischen Phase nicht eingeschränkt.



## Präparation der Mäuse

Für die Präparation wurden die Mäuse nach einer Kurznarkose mittels des Inhalationsnarkotikums Forene® mit einer Kombination aus 2 ml Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 10 mg/ml) und 2 ml Rompun® (Xylazinhydrochlorid 2 %ig) narkotisiert. Das Abdomen wurde mittels einer medianen Laparotomie eröffnet und das Herz über eine Durchtrennung der Rippen dargestellt und punktiert. Aus dem gewonnenen Blut wurde sofort der Blutzuckerwert bestimmt und der Rest des Blutes bei 1500 rpm für 20 min bei 4° C zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde für die MDA-Bestimmung bei -80° C tiefgefroren. Zudem wurden folgende Organe entnommen: Pankreas, beide Nieren, Milz und Thymus. Die linke Niere wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80° C. Eine Hälfte der rechten Niere in Carnoy-Lösung (hergestellt aus 6 Teilen 100 % Ethanol, 3 Teilen Chloroform und 1 Teil konzentrierter Essigsäure), die andere Hälfte der rechten Niere und die übrigen Organe in PFA (hergestellt aus 4 g Paraformaldehyd, das in 100 ml PBS bei 70° C gelöst wurde) konserviert. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel der Lagerungsmedien, indem die Organe aus der Carnoy-Lösung in 100 %igen Alkohol gelegt wurden und diejenigen Organe, die in PFA lagerten, in 70 %igen Alkohol. Alle Organe wurden daraufhin bei -4° C aufbewahrt. Sowohl die mit Paraformaldehyd, als auch die mit Carnoy-Lösung fixierten Organe konnten nun auf unbestimmte Zeit bis zur Paraffineinbettung gelagert werden.

## Fixation, Schneiden und Färbung der Organpräparate

Zur weiteren Fixation wurden die in PFA eingelegten Organe aus dem 70 % Ethanol für eine Stunde in 80 %, für eine weitere Stunde in 95 % und für weitere zwei Stunden in 100 % Ethanol gebracht und jeweils auf einem Kipptisch vom Ethanol gut umströmt. Diese Schritte der Alkoholreihe dienten dazu, die Organe zu entwässern. Für weitere zwei Stunden wurden dann die Organe in Xylol gegeben, um sie für Paraffin-Gewebewachs (dem späteren Gussmaterial) gewebebegängig zu machen. Nun erfolgte die einstündige Behandlung der Organe mit flüssigem Wachs, indem man sie in ein Wachsbad gab. Als nächster Schritt folgte der Wechsel der Organe in ein nicht verunreinigtes Wachs für eine weitere Stunde. Diese Arbeitsschritte dienten der Fixation des Gewebes mittels Gewebewachs. Um die Organe für die Schnitte vorzubereiten, wurden sie in Förmchen gegeben, in Wachs gegossen, auf Eis ausgekühlt und getrocknet. Die eingebetteten Organe wurden nun auf eine Dicke von 1-3 mm geschnitten, auf einen Objektträger gelegt und über Nacht bei 37° C in einem Wärmeschränk gelagert. Dieser Vorgang diente dem Entparaffinieren.

Die Färbung der Organschnitte mit Hematoxylin-Eosin (HE) erfolgt nach folgendem Schema:

Zeit ( in min)	Material
5	Xylol
5	Frisches Xylol
2	Methanol
2	Frisches Methanol (100 %)
2	Leitungswasser
2	Frisches Leitungswasser
30 s	Hematoxylin -> 1-2' unter fließendem Wasser bläuen
20 s	Eosin-> 3-4 mal abspülen

Die gefärbten Präparate wurden daraufhin in einer Alkoholreihe entwässert, was bedeutete, dass sie 1' in 50 % Ethanol, 1' in 70 % Ethanol, 1' in 95 % Ethanol, 1' in 100 % Ethanol, 3' in 100 % frischem Ethanol und letztlich 1' in Xylol getaucht wurden. Daraufhin konnten die Organschnitte eingedeckelt und mikroskopiert werden.

### Bestimmung des Blutzuckers aus EDTA-Blut

Für die Messung der Blutglucose mittels eines Reflotron Meßgerätes wurde den Mäusen eine Schwanzvene angeritzt und der heraustretende Blutropfen in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Die Probe wurde dann innerhalb einer Stunde mit dem Reflotron-Meßgerät gemessen, welches den Blutglucosewert, im nach Herstellervorschrift justierten Gerät, innerhalb von 120 s misst.

Die Messung der Glucose im Messgerät erfolgt folgendermaßen:

Die Probe fließt, unter Abtrennung der Erythrozyten, auf dem Reagenzträger in die Reaktionszone. D-Glucose wird dort mittels Glucoseoxidase durch Luftsauerstoff zu Delta-D-Gluconolacton oxidiert. Das dabei entstandene Wasserstoffperoxid oxidiert in der Gegenwart von Peroxidase, einem auf dem Teststreifen angebrachten Indikator. Die dadurch gebildete Farbe spiegelt eine bestimmte Glucosekonzentration der Probe wider.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism® 4.0. Hierbei wurde bei vergleichenden Untersuchungen zwischen 2 Gruppen der t-Test, bei mehreren Untersuchungsgruppen der 1-way-Anova-Test mit Bonferroni als post-Test-Verfahren, bzw. bei nicht normalverteilten Gruppen mit einer großen Varianz der Kruskal-Wallis-Test mit Dunns als post-Test-Verfahren verwendet. Zur Auswertung von Korrelationskurven verwendeten wir den Parameter  $r^2$  und p, um eine signifikante Korrelation festzustellen. Um Überlebenskurven darzustellen, verwendeten wir Kaplan-Meier-Kurven.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Klinischer Teil

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sollten in dieser Arbeit Isoprostane ( $F_2$ -Isoprostane, 8-epi-PGF<sub>2α</sub>) als Marker für oxidativen Stress bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern bestimmt werden. Das mit dargestellte PGE<sub>2</sub> diente zur Abbildung der enzymatisch bedingten Prostaglandinbildung. Daten wurden von 38 Kindern aus der Tagesklinik der Philipps-Universität Marburg und von 60 Kindern aus einer parallel durchgeführten Normwertstudie (nur relevante Daten aufgezeigt) erhoben. Die Normwertstudie wurde aufgrund einer anderen Fragestellung durchgeführt, allerdings beinhaltete sie die für die Auswertung meiner Studie erforderlichen Daten. Die Studie war nicht dahingehend konzipiert, dass auch Blutproben zur Analyse entnommen wurden, so dass ich für die Laborparameter MDA, Blutzucker und HbA<sub>1c</sub>, als auch für klinische Parameter keine Vergleichswerte hatte. Eingeschlossen wurden in diese Studie gesunde Kinder aus verschiedenen Kindergärten und Schulen der Region. Zusammenfassend sollte gezeigt werden, inwieweit sich Isoprostane in ihrer Konzentration bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern und gesunden Kindern unterscheiden und ob es Korrelationen zwischen ihnen und dem herkömmlichen MDA bzw. klinischen Parametern gibt.

Wie in der unten dargestellten Tabelle zu sehen ist, konnten für die Gruppe der an Typ 1 Diabetes erkrankten Kinder hinsichtlich der klinischen Angaben und bestimmter laborchemischer Parameter keine geschlechtsspezifischen Unterschiede ausgemacht werden. Daher wurden im Folgenden die Daten nicht nach Geschlecht aufgetrennt. Für beide Gruppen liegen ähnliche Werte für die Dauer der Erkrankung, den aktuellen Blutzucker, das HbA<sub>1c</sub>, den systolischen und diastolischen Blutdruck, das Serumkreatinin und das MDA vor.

	Weiblich (Mean±S.E.M.)	Männlich (Mean±S.E.M.)
Dauer (Jahren)	3,9 ± 3,67	3,56 ± 2,16
Blutzucker (g/dl)	259,1 ± 127,2	243,4 ± 84
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,59 ± 1,54	8,57 ± 1,41
RR systolisch (mmHg)	111,3 ± 15,84	114,1 ± 13,43
RR diastolisch (mmHg)	64,55 ± 14,66	62,73 ± 9,78
Kreatinin (mg/ml)	0,6 ± 0,18	0,64 ± 0,16
MDA (mmol)	2,45 ± 3,1	1,69 ± 2,13

Fig.5. Darstellung der untersuchten Kinderpopulation, die an Typ 1 Diabetes erkrankt ist.

Für die Kontrollgruppe lagen mir lediglich die Werte für die Prostaglandine und Isoprostane, sowie für das Urinkreatinin im Spontanurin vor. Daher konnte keine vergleichende Tabelle für oben genannte Parameter für gesunde und kranke Kinder aufgezeigt werden. In der Normwertstudie wurde ebenfalls nicht zwischen männlich und weiblich unterschieden.

### Darstellung der erhobenen Daten für die beiden Untersuchungsgruppen (Typ 1 Diabetes vs. Gesund)

Alle hier verwendeten Konzentrationen für die Prostaglandine und Isoprostane beziehen sich auf das Urinkreatinin, um etwaige Beeinflussungen durch Störfaktoren, wie zum Beispiel Volumeneffekte bei Polyurie bei Diabetes mellitus, zu verhindern.

Die von mir erhobenen Parameter ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{F}_2$ -Isoprostane und  $8\text{-epi-PGF}_{2\alpha}$ ) werden im Folgenden für die untersuchten gesunden (GES) und kranken (DM 1) Kinder dargestellt. Es wird in den Graphen jeweils die gesunde Gruppe der erkrankten Gruppe gegenübergestellt.

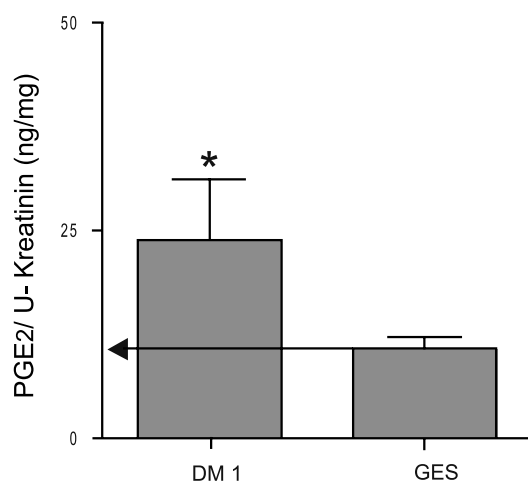


Fig.6.  $\text{PGE}_2 / \text{U-Kreatinin (ng/mg)}$  bei Kindern mit Typ 1 Diabetes (DM 1) und gesunden Kindern (GES).  $\text{PGE}_2$  und Kreatinin wurden im Spontanurin bestimmt. (\* $p=0,0338$ )

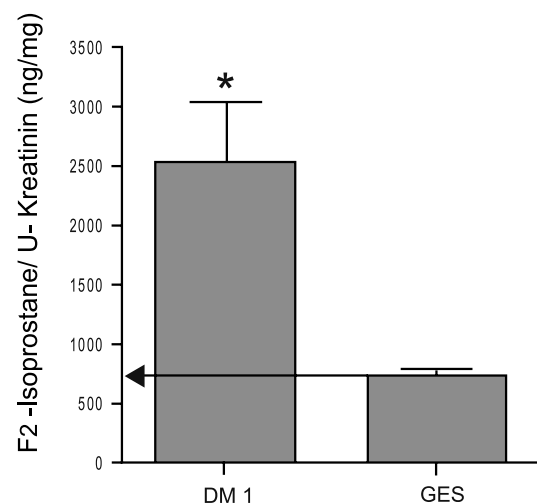


Fig.7.  $\text{F}_2\text{-Isoprostane} / \text{U-Kreatinin (ng/mg)}$  bei Kindern mit Typ 1 Diabetes (DM 1) und gesunden Kindern (GES).  $\text{F}_2\text{-Isoprostane}$  und Kreatinin wurden im Spontanurin bestimmt. (\* $p=0,0006$ )

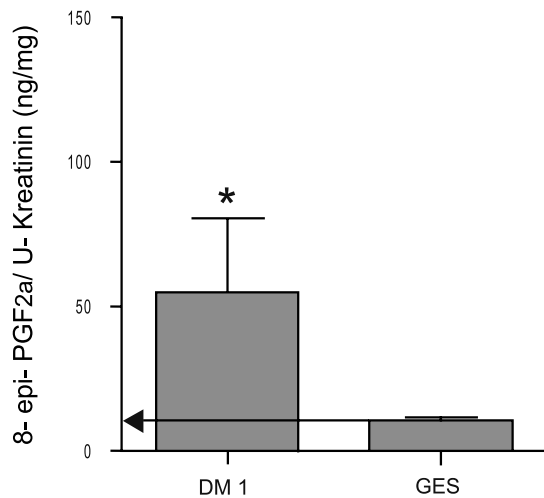


Fig.8. 8-epi-PGF<sub>2α</sub> / U-Kreatinin (ng/mg) bei Kindern mit Typ 1 Diabetes (DM 1) und gesunden Kindern (GES). 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und Kreatinin wurden im Spontanurin bestimmt. (\*p<0,0001)

Gezeigt werden konnte, dass es bei allen drei Parametern (PGE<sub>2</sub>, 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, F<sub>2</sub>-Isoprostane) zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration bei an Diabetes mellitus erkrankten Kindern kam. Für das Prostaglandin PGE<sub>2</sub> konnte eine signifikante Erhöhung um den Faktor 2,3 der Konzentration gezeigt werden. Auch für die beiden anderen Parameter F<sub>2</sub>-Isoprostane (um den Faktor 3,4 erhöht) und 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (um den Faktor 5 erhöht) konnte eine signifikante Zunahme der Konzentration bei den erkrankten, im Vergleich zu den gesunden Kindern, gemessen werden.

#### Vergleichende Darstellung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen zu laborchemischen Parametern

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob F<sub>2</sub>-Isoprostane im Urin mit klinischen, beziehungsweise laborchemischen Parametern korrelieren, die bei dieser Erkrankung typischerweise gemessen werden. Als Vergleichsparameter dienen aktuelle Blutzuckerwerte, HbA<sub>1c</sub> und MDA.

Dargestellt sind die Korrelationen zwischen Blutzucker und den von mir gewählten Parametern PGE<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>-Isoprostane und 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden:

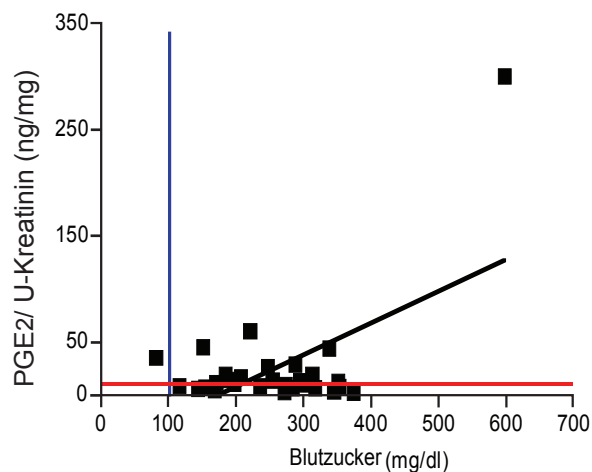


Fig.9. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen  $\text{PGE}_2$ /Urinkreatinin und dem aktuellen Blutzucker für die Gruppe der an Typ 1 Diabetes erkrankten Kinder. Als Grenzen angegeben sind Normwerte für den aktuellen Blutzucker (blau) und der Median für das  $\text{PGE}_2$  bei gesunden Kindern (rot).  $n=32$   
( $r^2=0,326$ ,  $p<0,05$ )

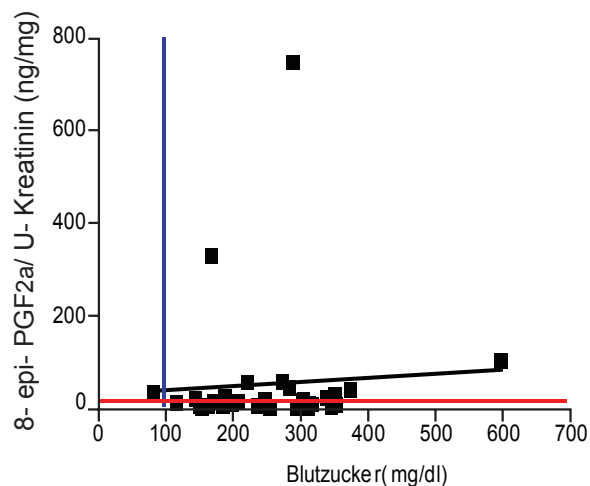


Fig.10. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ /Urinkreatinin und dem aktuellen Blutzucker für die Gruppe der an Typ 1 Diabetes erkrankten Kinder. Als Grenzen angegeben sind Normwerte für den aktuellen Blutzucker (blau) und der Median für das 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  bei gesunden Kindern (rot).  $n=32$   
( $r^2=0,004$ ,  $p>0,05$ )

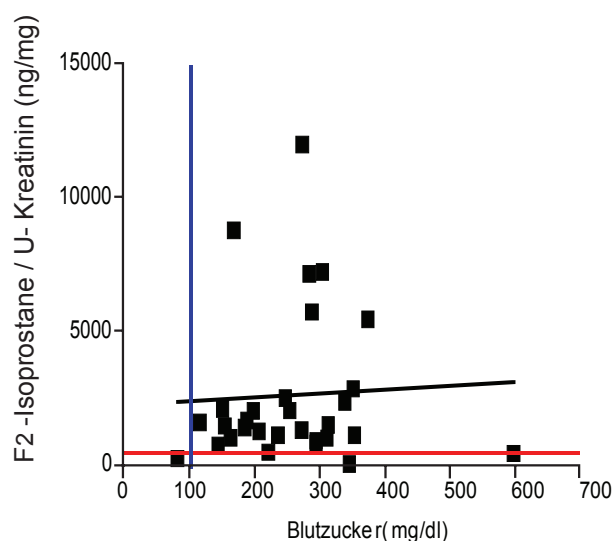


Fig.11. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen  $\text{F}_2$ -Isoprostanen/Urinkreatinin und dem aktuellen Blutzucker für die Gruppe der an Typ 1 Diabetes erkrankten Kinder. Als Grenzen angegeben sind Normwerte für den aktuellen Blutzucker (blau) und der Median für die  $\text{F}_2$ -Isoprostane bei gesunden Kindern (rot).  $n=32$   
( $r^2=0,0025$ ,  $p>0,05$ )

Es kann für die untersuchten Isoprostane ( $F_2$ -Isoprostane, 8-epi-PGF<sub>2α</sub>) keine Korrelation zu den aktuellen Blutzuckerwerten beobachtet werden. Für das PGE<sub>2</sub> findet sich eine signifikante Korrelation.

Des Weiteren wird die Korrelation der erhobenen Parameter mit HbA<sub>1c</sub> untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Punktscharen dargestellt:

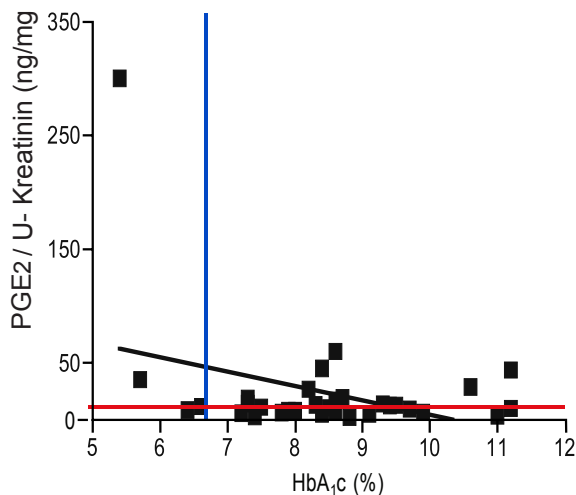


Fig.12. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen PGE<sub>2</sub> /Urinkreatinin und HbA<sub>1c</sub> bei an Typ1 Diabetes erkrankten Kindern. Als Grenzen angegeben sind Normwerte für HbA<sub>1c</sub> (blau) und der Median für das PGE<sub>2</sub> bei gesunden Kindern (rot). n=32  
( $r^2=0,125$ ,  $p<0,05$ )

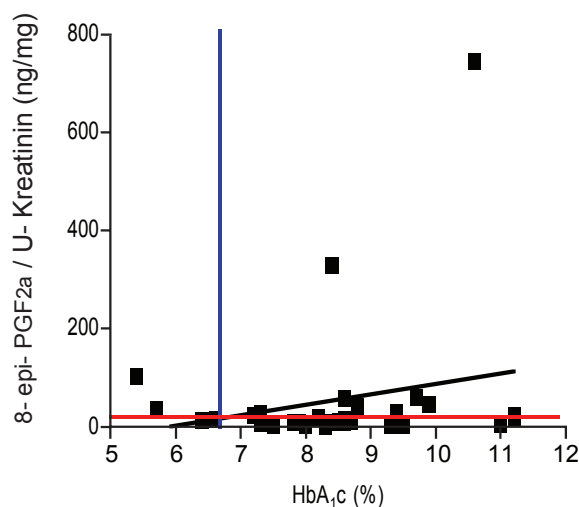


Fig.13. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen 8-epi-PGE<sub>2α</sub>/Urinkreatinin und HbA<sub>1c</sub> bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern. Als Grenzen angegeben sind Normwerte für HbA<sub>1c</sub> (blau) und der Median für das 8-epi-PGF<sub>2α</sub> bei gesunden Kindern (rot). n=32  
( $r^2=0,048$ ,  $p>0,05$ )

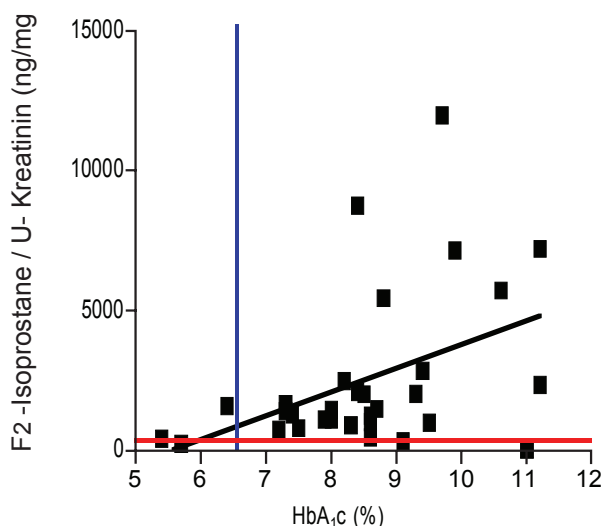


Fig.14. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen  $F_2$ -Isoprostanen/Urinkreatinin und HbA<sub>1c</sub> bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern. Als Grenzen angegeben sind Normwerte für HbA<sub>1c</sub> (blau) und der Median für die  $F_2$ -Isoprostane bei gesunden Kindern (rot). n=32  
( $r^2=0,018$ ,  $p<0,05$ )

Für das HbA<sub>1c</sub> kann für das 8-epi-PGF<sub>2α</sub> keine Korrelation gezeigt werden. Allerdings zeigte sich eine signifikante Korrelation zu den F<sub>2</sub>-Isoprostanen. Zu PGE<sub>2</sub> konnte für HbA<sub>1c</sub> eine negative signifikante Korrelation gefunden werden.

### Vergleichende Darstellung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen zu Malondialdehyd

Um die Validität und Güte der neuen Parameter zu untersuchen, führte ich eine vergleichende Untersuchung zwischen den vermutlich neuen Parametern für oxidativen Stress, den F<sub>2</sub>-Isoprostanen im Urin, und einem älteren Parameter für oxidativen Stress, dem Malondialdehyd, gemessen im Serum, durch.

Im Folgenden sind die Korrelationsscharen mit Malondialdehyd (MDA) dargestellt. Verwendet werden hierfür von mir in einem Assay bestimmte Werte.

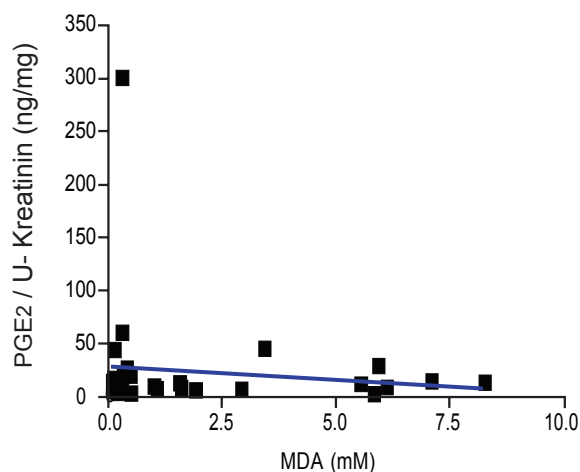


Fig.15. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen MDA und PGE<sub>2</sub>/Urinkreatinin bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern. n=32 ( $r^2 = 0,014$ ,  $p > 0,05$ )

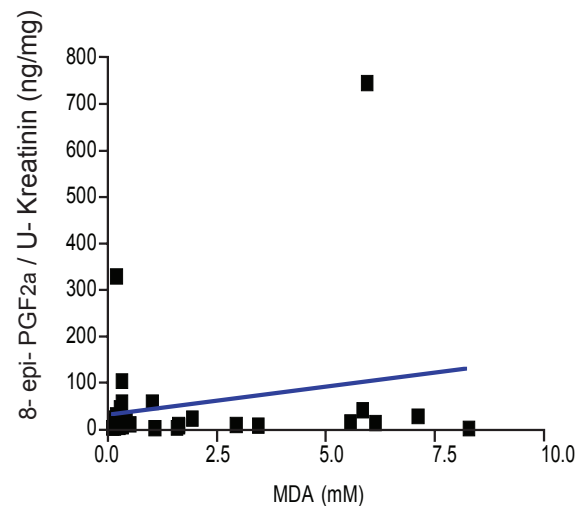


Fig.16. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen MDA und 8-epi-PGF<sub>2α</sub>/Urinkreatinin bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern. n=32 ( $r^2 = 0,044$ ,  $p > 0,05$ )

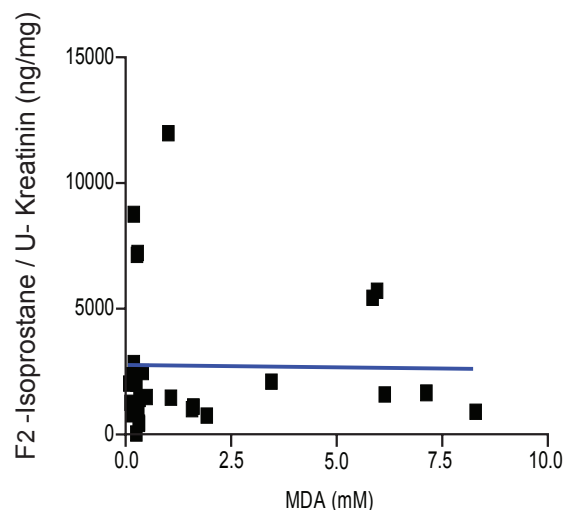


Fig.17. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen MDA und F<sub>2</sub>-Isoprostanen/Urinkreatinin bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern. n=32 ( $r^2 = 0,0003$ ,  $p > 0,05$ )



Für Malondialdehyd kann keine Korrelation zu dem Prostaglandin  $\text{PGE}_2$  ( $r^2=0,014$ ), den  $\text{F}_2$ -Isoprostanen ( $r^2=0,044$ ) und dem 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $r^2=0,0003$ ) gezeigt werden.

Zusammenfassend sind  $\text{F}_2$ -Isoprostane, 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{PGE}_2$  bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern im Vergleich zu gesunden Kindern signifikant erhöht, allerdings kann nur für das  $\text{HbA}_{1c}$  eine Korrelation zu den  $\text{F}_2$ -Isoprostanen gezeigt werden, für den aktuellen Blutzucker gibt es keine Korrelation zu den untersuchten Isoprostanen. Es besteht darüber hinaus keine Korrelation zu dem bereits bekannten, älteren Parameter zur Messung des oxidativen Stresses, dem Malondialdehyd (MDA).

Auch für Malondialdehyd kann keine Korrelation zu  $\text{HbA}_{1c}$  und dem aktuellen Blutzucker gefunden werden. Die Ergebnisse hierfür sind in den folgenden Diagrammen dargestellt.

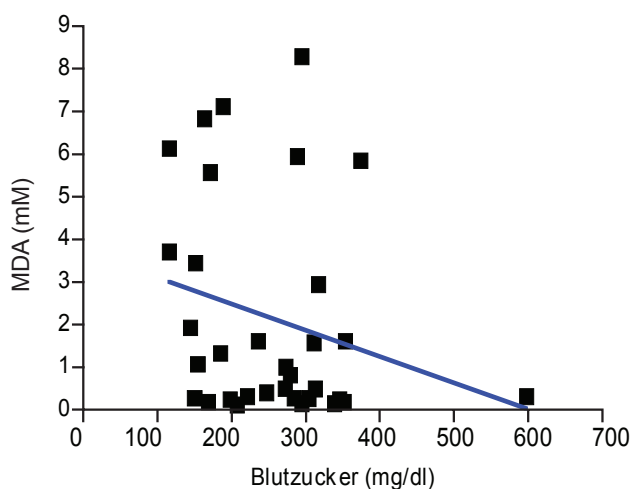


Fig.18. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen dem aktuellen Blutzucker BZ (mg/dl) und MDA (mM).  $n=32$  ( $r^2=0,057$ ,  $p>0,05$ )

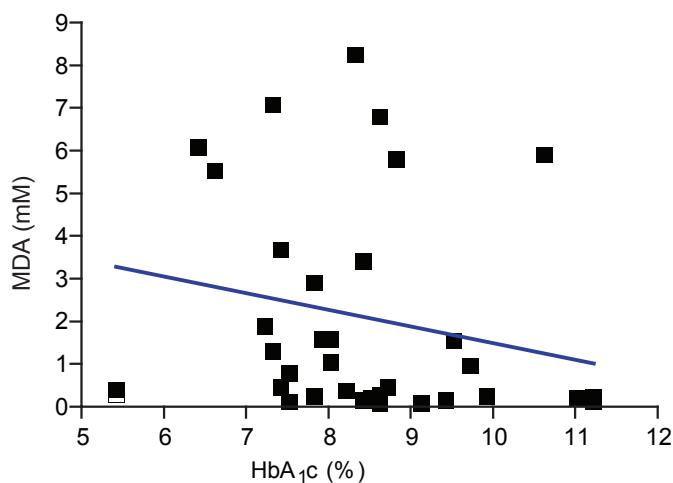


Fig.19. Punkteschar zur Darstellung der Korrelation zwischen  $\text{HbA}_{1c}$  (%) und MDA (mM).  $n=32$  ( $r^2=0,044$ ,  $p>0,05$ )

### III. 2. Tierexperimenteller Teil

Im Rahmen der klinischen Studie konnte eine erhöhte Konzentration der  $F_2$ -Isoprostane, des 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  und des PGE $_2$  bei an Typ 1 Diabetes Erkrankten gemessen werden. Zudem fand sich für die  $F_2$ -Isoprostane eine Korrelation zu HbA $_{1c}$ , für alle weiteren Korrelationsmöglichkeiten konnte keine Signifikanz gefunden werden. Zur Klärung der Frage, inwieweit ROS im Rahmen des Diabetes mellitus eine Rolle spielt, führte ich ergänzend Untersuchungen am Tiermodell durch. Hierfür erfolgte die Untersuchung der Tiere nach Induktion eines Diabetes mellitus über 10 Tage ohne jegliche Therapie. Die gewonnenen Daten werden zunächst für die verschiedenen Versuchsmodele (C57Bl6-Wildtypmäuse, COX-1 $^{-/-}$ -Mäuse, COX-2 $^{-/-}$ -Mäuse) dargestellt. Außerdem erfolgte eine Untersuchung an C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors SC236 als vergleichende Versuchsanordnung zu den Untersuchungen an COX-2 $^{-/-}$ -Mäusen. Eine weitere Untersuchung erfolgte unter Gabe des Antioxidans Tempol, um einen etwaigen Effekt des Radikalfängers bezüglich des klinischen Verlaufs und laborchemischer Parameter bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Versuchstieren aufzuzeigen. Gesondert dargestellt ist der Unterschied zwischen Hochdosis- und Niedrigdosisinduktion des Diabetes mellitus durch Streptozotozin. Abschließend wurden die Daten mit weiteren Parametern wie z.B. dem aktuellen Blutzucker auf eventuelle Korrelation untersucht.

#### Histologische Präparate des Pankreas im Vergleich

In der histologischen Aufarbeitung des Pankreas ergab sich folgendes Bild: Bei einer an Diabetes mellitus erkrankten Maus fand sich eine Abnahme der Anzahl und eine Veränderung der Struktur der Inselzellen.

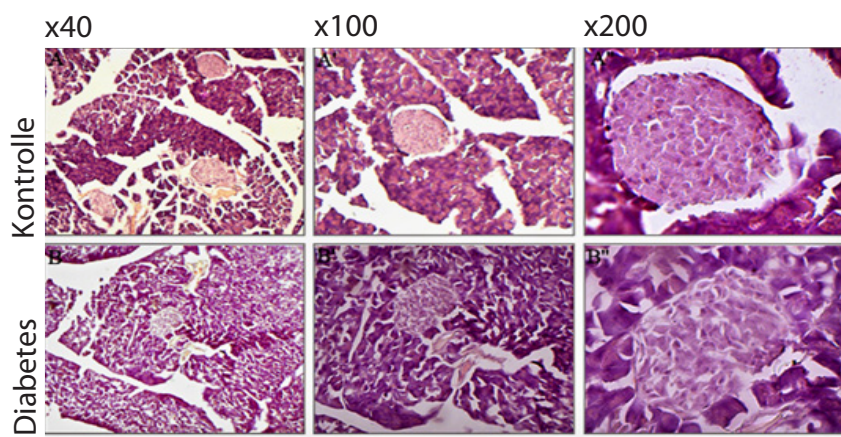


Fig.20. Histologische Darstellung des Pankreas bei gesunden und an Typ 1 Diabetes erkrankten Mäusen in der HE-Färbung.

### Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen – Diabetesinduktion mit einer Hochdosis Streptozotozin (einmalig 200 mg/kg KG)

Es erfolgte in der ersten Versuchreihe die Induktion eines Diabetes mellitus bei C57Bl6-Wildtypmäusen durch die einmalige Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG. Man konnte am dritten Tag nach Induktion bereits pathologisch erhöhte Blutzuckerwerte nachweisen.

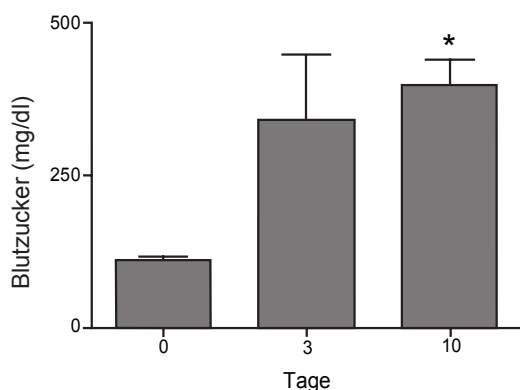


Fig.21. Blutzuckerverlauf bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach der einmaligen Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG beobachtet über 10 Tage nach Induktion. n=17 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

Zudem konnte nach der Induktion eines Typ 1 Diabetes die Zunahme der Diurese, im Rahmen der vermehrten Ausscheidung der osmotisch wirksamen Glucose im Urin, und eine Proteinurie, als Zeichen der Nierenschädigung, beobachtet werden.

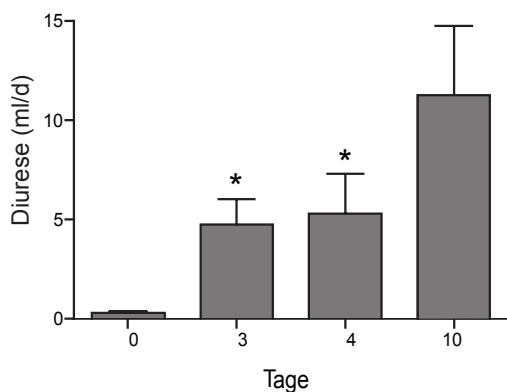


Fig.22. Darstellung der Diurese bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach der einmaligen Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG beobachtet über 10 Tage nach Induktion. n=17 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

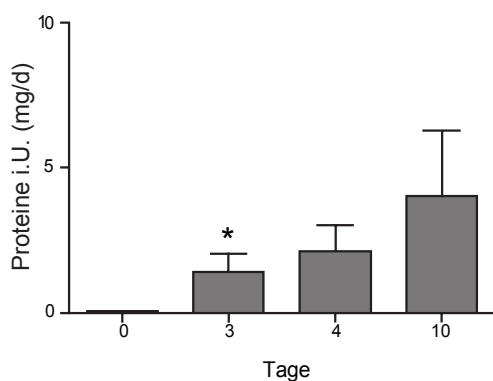


Fig.23. Darstellung der Proteinurie bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach der einmaligen Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG beobachtet über 10 Tage nach Induktion. n=17 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

Primär sollte an Wildtypmäusen (C57Bl6) gezeigt werden, ob ein Anstieg der F<sub>2</sub>-Isoprostane über die gewählte Zeitspanne von 10 Tagen nach Induktion eines Diabetes mellitus zu beobachten ist.

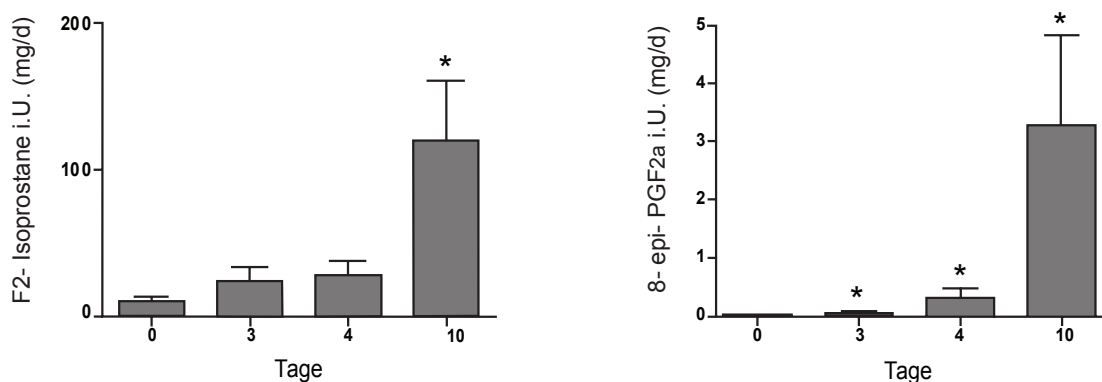


Fig.24. Darstellung der Exkretion an  $F_2$ -Isoprostanen und 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  im Urin für C57Bl6-Wildtypmäuse im Verlauf nach Induktion eines Diabetes mellitus. n=17 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

In den oben abgebildeten Graphiken zeigt sich ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Parameter bis zum Beobachtungsende (Tag 10) nach der Induktion eines Typ 1 Diabetes bei Wildtypmäusen.

#### Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen – Diabetesinduktion mit einer Niedrigdosis Streptozotozin (40mg/kg KG über 5d)

Zur Überprüfung, ob es durch eine einmalige Hochdosisgabe im Vergleich zu einer fünfmaligen Niedrigdosisgabe zu einer äquivalenten Induktion eines Diabetes mellitus kommt, führte ich einen vergleichenden Versuch durch. Nach Erhalt der Daten wurden die Untersuchungen am Niedrigdosis-Versuchsmodell eingestellt, da es nach Gabe von Streptozotozin über 5 Tage innerhalb des Beobachtungszeitraums zu keiner Entwicklung eines Diabetes mellitus kam (siehe auch Fig. 25). Es konnten 3 Monate nach Induktion des Diabetes mellitus immer noch fast normale Blutzuckerwerte gemessen werden, daher kann nicht von einer raschen Entwicklung eines Diabetes mellitus ausgegangen werden.

Das Versagen des Modells zur Induktion muss auf einen Fehler in der Methodik zurückgeführt werden. Als weitere Möglichkeit muss ein zu kurzer Beobachtungszeitraum in Betracht gezogen werden, da der Diabetes mellitus im Rahmen des Versuchs mit niedriger Induktionsdosis am ehesten sehr langsam eintritt und sich erst nach Wochen manifestiert und zu messen ist. Wir entschlossen uns daher, in allen kommenden Versuchen, eine Induktion des Diabetes mellitus mit einer einmaligen Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG durchzuführen.

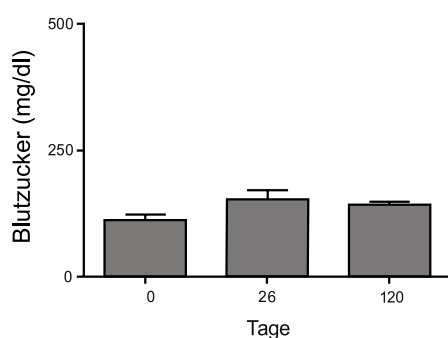


Fig.25. Darstellung des Blutzuckerverlaufs nach Gabe von 40 mg Streptozotozin/kg KG an 5 aufeinander folgenden Tagen bei C57Bl6-Wildtypmäuse beobachtet über 120 Tage nach Induktion. n=9

## Untersuchungen an COX-1<sup>-/-</sup>- Mäusen

In einem weiteren Schritt untersuchte ich Proben von COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen, da die Cyclooxygenase als wichtiges Enzym im Rahmen der Entstehung der F<sub>2</sub>-Isoprostane diskutiert wird. Zu untersuchen galt es, ob sich hierdurch ein Hinweis für den Entstehungsweg der F<sub>2</sub>-Isoprostane ergibt und ein Zusammenhang des Isoenzym mit dem Diabetes mellitus bestehen könnte. Anschließend wurde in einer neuen Versuchsreihe das zweite Isoenzym, die Cyclooxygenase-2 (COX-2), untersucht (Darstellung im nächsten Abschnitt).

Im Versuch zeigte sich, dass für COX-1<sup>-/-</sup>-Mäuse nach der Induktion eines Diabetes mellitus mittels Streptozotizin ähnliche Verläufe über 10 Tage beobachtet werden konnten, wie für C57Bl6-Wildtypmäuse. Dies gilt in Bezug auf den Blutzuckeranstieg, die Diurese und die Proteinurie.

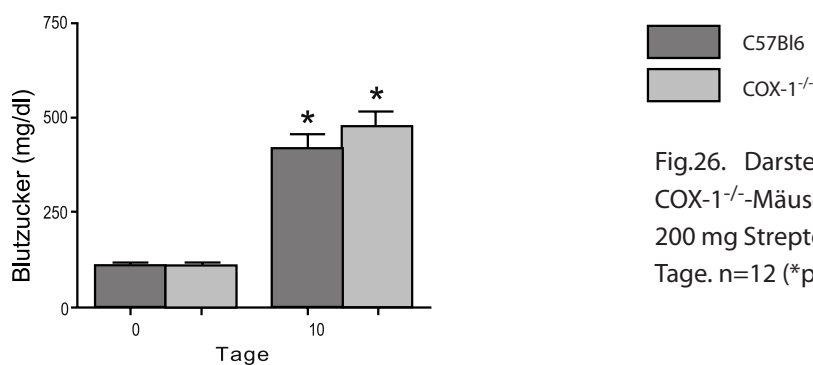


Fig.26. Darstellung des Blutzuckerverlaufs bei COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen nach der einmaligen Gabe von 200 mg Streptozotizin/kg KG beobachtet über 10 Tage. n=12 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

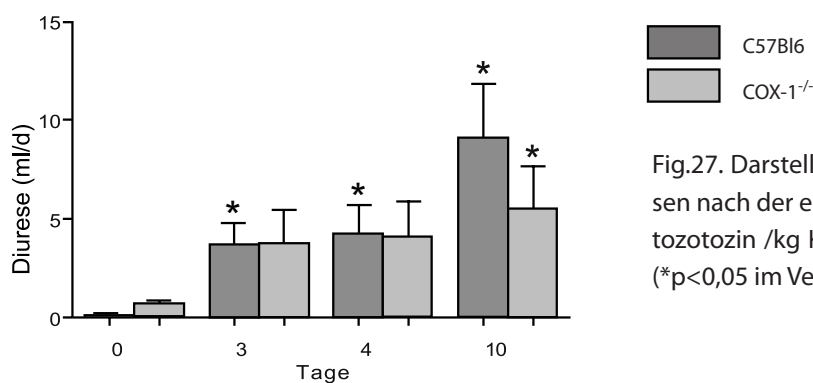


Fig.27. Darstellung der Diurese bei COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen nach der einmaligen Gabe von 200 mg Streptozotizin /kg KG beobachtet über 10 Tage. n=12 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

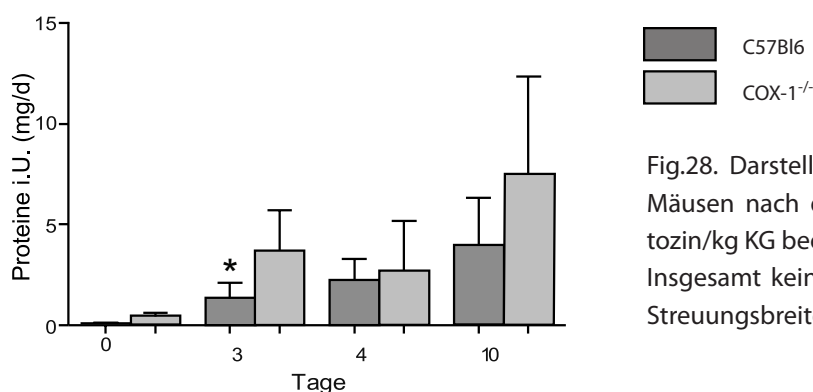


Fig.28. Darstellung der Proteinurie bei COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen nach der Gabe von 200 mg Streptozotizin/kg KG beobachtet über 10 Tage. n=12  
Insgesamt keine Signifikanz aufgrund zu großer Streubreite der gemessenen Werte.

Im Weiteren sind die Verläufe für die  $F_2$ -Isoprostane und für das 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  dargestellt.

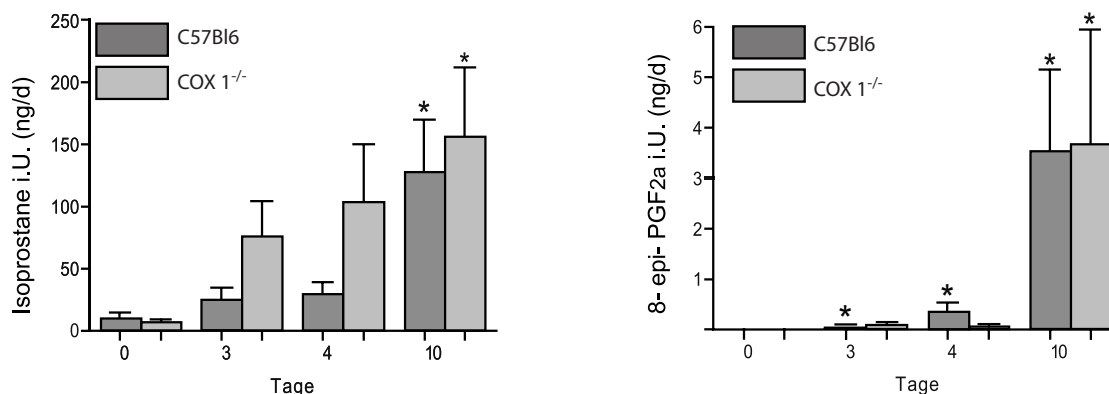


Fig.29. Darstellung des Verlaufs der  $F_2$ -Isoprostane und des 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ . n=12 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0) Im Vergleich zwischen C57Bl6 und COX-1 $^{-/-}$  zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Sowohl für die  $F_2$ -Isoprostane, als auch für das 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  konnte eine signifikante Zunahme der Konzentration über die beobachteten 10 Tage verzeichnet werden. Im Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Exkretionsmenge sowohl für die  $F_2$ -Isoprostane, als auch für das 8-epi-PGF $_{2\alpha}$ .

### Untersuchungen an COX-2 $^{-/-}$ - Mäusen

Zur Klärung meiner Fragestellung bezüglich der Entstehung der  $F_2$ -Isoprostane erfolgte im Weiteren die Untersuchung der Proben von COX-2 $^{-/-}$ -Mäusen. Es wurden erneut dieselben Parameter betrachtet. Zu Beobachten war ein vorzeitiges Versterben der Mäuse (siehe unten) unter der Hochdosisgabe an Streptozotizin (200 mg/kg KG) am 3./4. Tag des Versuchs. Daher erfolgten zunächst Untersuchungen zur Dosisfindung mittels einer Verdünnungsreihe. Ziel hierbei war es, dass alle Tiere die Untersuchungsdauer überlebten und gleichzeitig einen Diabetes mellitus entwickelten.

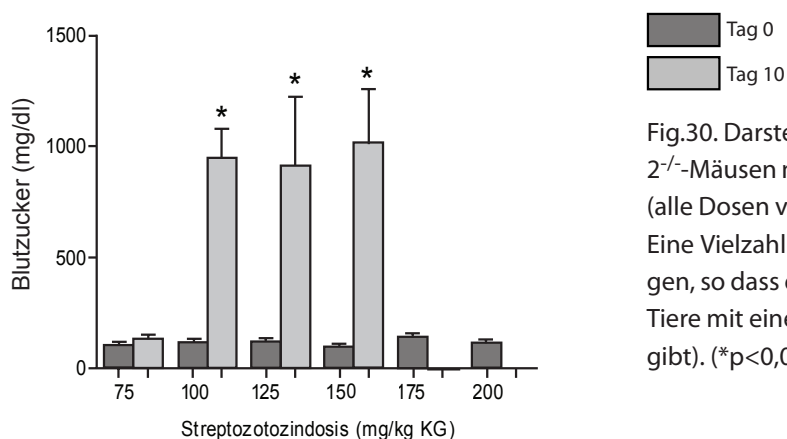


Fig.30. Darstellung des Blutzuckerverlaufs bei COX-2 $^{-/-}$ -Mäusen nach Induktion eines Diabetes mellitus (alle Dosen von 75 bis 200 mg/kg KG)(zu beachten: Eine Vielzahl der Tiere verstarb schon nach 3-4 Tagen, so dass es meist keine Werte für den Tag 10 für Tiere mit einer Induktionsdosis von >150mg/kg KG gibt). (\*p<0,05 gegenüber Tag 0).

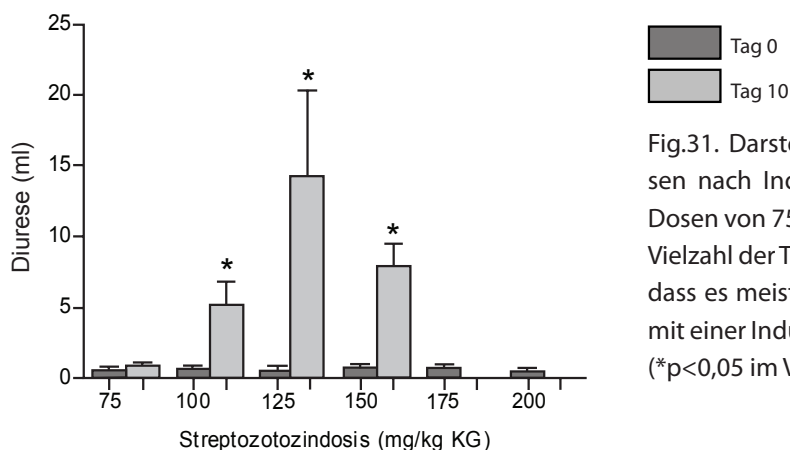


Fig.31. Darstellung der Diurese bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Induktion eines Diabetes mellitus (alle Dosen von 75 bis 200 mg/kg KG)(zu beachten: Eine Vielzahl der Tiere verstarb schon nach 3-4 Tagen, so dass es meist keine Werte für den Tag 10 für Tiere mit einer Induktionsdosis von >150mg/kg KG gibt). (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

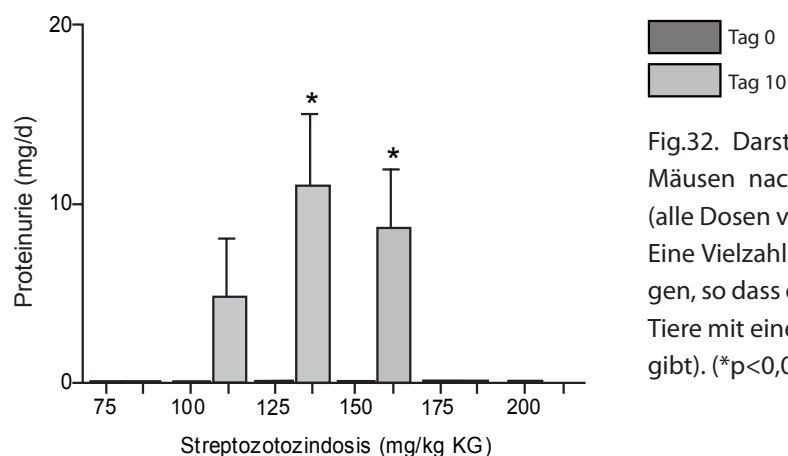


Fig.32. Darstellung der Proteinurie bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Induktion eines Diabetes mellitus (alle Dosen von 75 bis 200 mg/kg KG)(zu beachten: Eine Vielzahl der Tiere verstarb schon nach 3-4 Tagen, so dass es meist keine Werte für den Tag 10 für Tiere mit einer Induktionsdosis von >150mg/kg KG gibt). (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

Aus den oben dargestellten Graphen lässt sich erkennen, dass es unter einer Induktionsdosis von 125 mg/kg KG (auch für 100 und 150 mg/kg KG) zur Ausbildung eines Diabetes mellitus kommt und die Tiere in den meisten Fällen auch das Ende des Beobachtungszeitraums erreichen, so dass Endwerte erhoben werden konnten. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des Blutzuckers, der Diuresemenge und der Proteinurie für diese Tiere.

Unter der Gabe einer reduzierten Dosis von 125 mg Streptozotocin / kg KG bei den COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen können für die Parameter Blutzucker, Proteinurie und Diurese ähnliche Verläufe über die Beobachtungsdauer von 10 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe der C57Bl6-Mäuse dargestellt werden (hier nicht abgebildet).

Zudem war zu beobachten, dass eine Vielzahl der Tiere (zu sehen an der Kaplan-Meier-Überlebenskurve) das Ende der festgesetzten Untersuchungsdauer nicht erreichten und bereits nach ungefähr 3-4 Tagen verstarben. Dies gilt v.a. für Tiere, die eine Dosis > 125 mg Streptozotocin/kg KG erhielten.

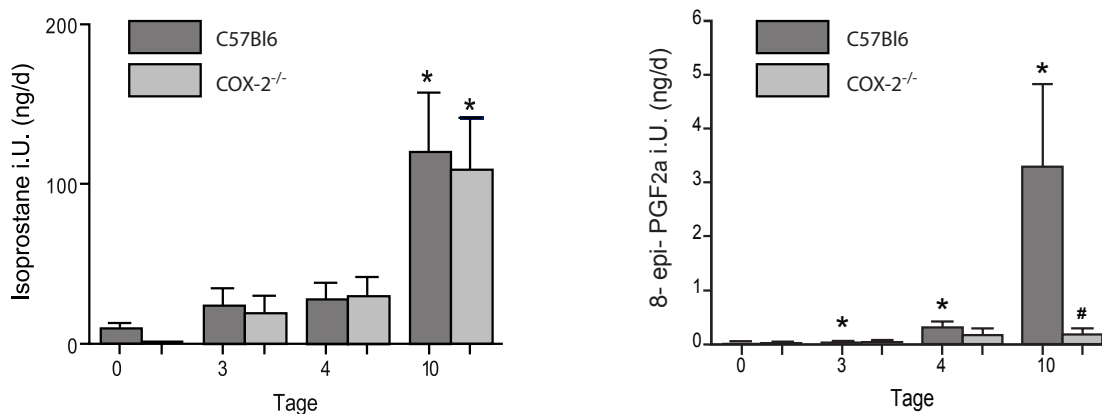


Fig.33. Darstellung des Verlaufs von F<sub>2</sub>-Isoprostanen und 8-epi-PGF<sub>2α</sub> bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Werte für die COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden unter einer Dosierung von 125 mg Streptozotocin/kg KG, im Vergleich zu einer Dosierung von 200 mg Streptozotocin/kg KG bei C57Bl6-Wildtypmäusen erhoben. Im Vergleich zwischen C57Bl6 und COX-2<sup>-/-</sup> ist für die F<sub>2</sub>-Isoprostane kein signifikanter Unterschied auszumachen, für das 8-epi-PGF<sub>2α</sub> findet sich ein signifikanter Unterschied der Menge an Tag 10. (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0, #p<0,05 im Vergleich zum Hochdosisversuch mit 200 mg Streptozotocin/kg KG)

Für alle dargestellten Untersuchungen kann eine signifikante Zunahme der Konzentrationen der Parameter im Verlauf über 10 Tage beobachtet werden. Es liegt für die F<sub>2</sub>-Isoprostane im Vergleich zwischen den COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Diabetesinduktion mit einer Streptozotocindosis von 125 mg/kg KG) und den C57Bl6-Mäusen (Diabetesinduktion mit einer Streptozotocindosis von 200 mg/kg KG) kein relevanter Unterschied vor, allerdings zeigt sich für den Untersuchungsparameter 8-epi-PGF<sub>2α</sub> eine eindeutige Reduktion der Konzentration in der Gruppe der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse an Tag 10. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Abhängigkeit zwischen der Bildung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und dem Vorliegen des Isoenzym COX-2 diskutiert werden.

#### Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die Versuchsreihen mit COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen

Nur 20% der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse erreichten nach der Gabe von 200 mg Streptozotocin/kg KG das Ende des Untersuchungszeitraumes, die anderen verstarben, wie in der unten gezeigten Überlebenskurve zu sehen ist, bereits wenige Tage nach Induktion des Diabetes mellitus.



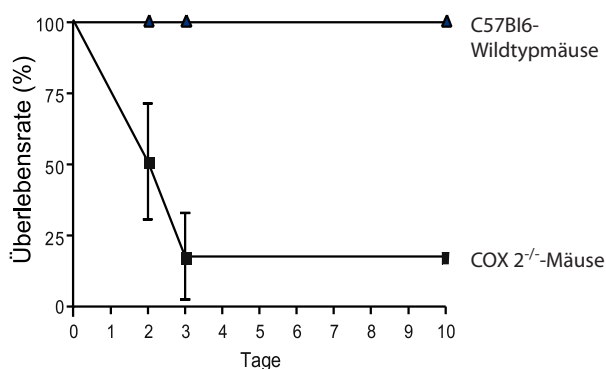


Fig.34. Kaplan-Meier-Überlebenskurven für COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse, die zur Induktion des Diabetes mellitus eine Dosis von 200 mg Streptozotocin/kg KG erhielten. Nach 3 Tagen sind schon 80% der Mäuse verstorben. Zum Vergleich überlebten aus der Vergleichsgruppe (C57Bl6-Wildtypmäuse) unter Gabe der selben Dosis 100% der Tiere.

Für die COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse, die eine reduzierte Einmaldosis an Streptozotocin (125 mg/kg KG) erhielten, konnte ein Überlebensvorteil beobachtet werden. Die Überlebenskurve ist im folgenden Graphen dargestellt. Hier erreichten 70% der Tiere das Ende des Beobachtungszeitraums.

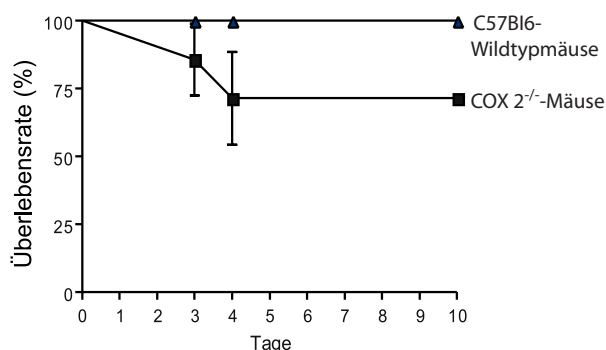
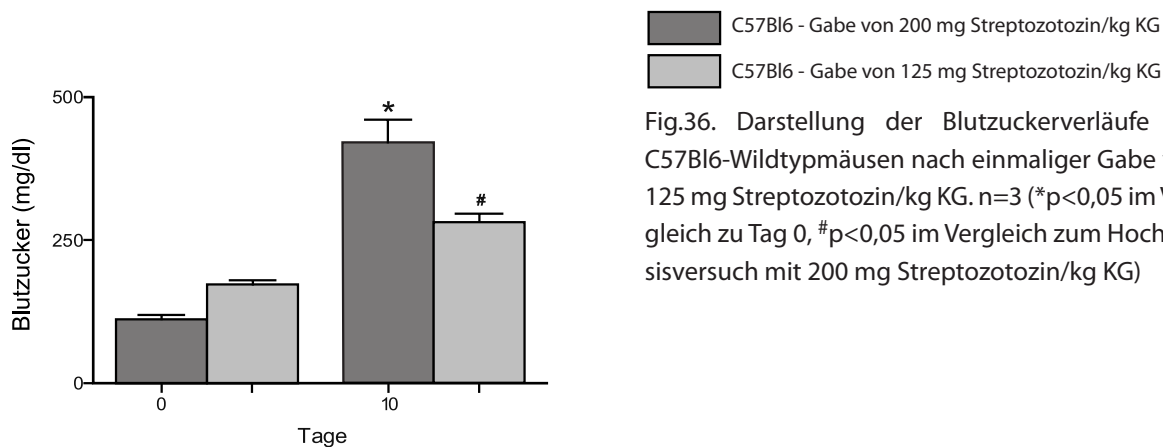


Fig.35. Kaplan-Meier-Überlebenskurve, dargestellt für alle COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse, die zur Diabetesinduktion eine reduzierte Dosis von 125 mg/kg KG erhielten. Zum Vergleich überlebten aus der Vergleichsgruppe (C57Bl6-Wildtypmäuse) unter Gabe der selben Dosis 100% der Tiere.

Die Ergebnisse aus der Untergruppe der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen zusammenfassend, dass die Tiere unter der Gabe von 200 mg Streptozotocin/kg KG den Beobachtungszeitraum meist nicht überlebten und vorzeitig verstarben. Daher ist eine Dosisreduktion auf die von mir ermittelte Dosis von 125 mg Streptozotocin/kg KG notwendig.

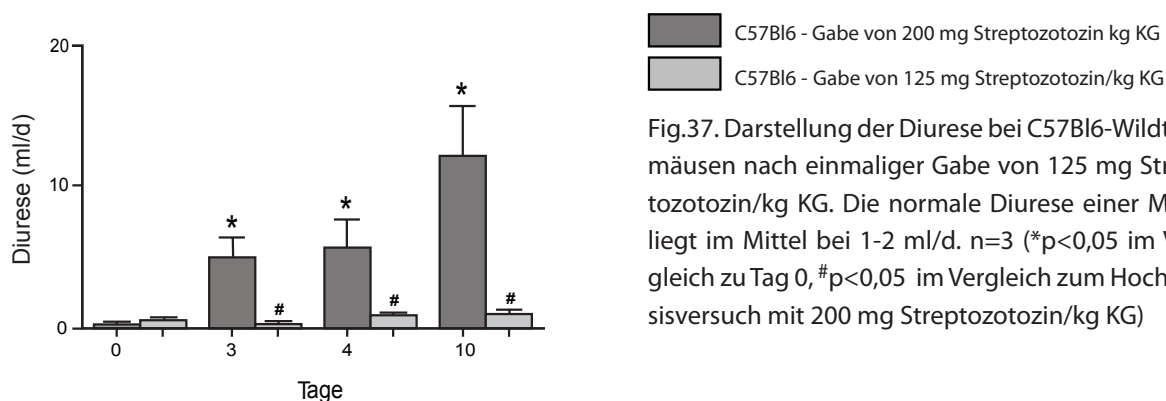
Eine entsprechende Dosis (125 mg Streptozotocin/kg KG) wurde in ihrer Wirkung zudem in einem Modell mit Wildtypmäusen (C57Bl6) untersucht. Die Ergebnisse sind im kommenden Teil der Arbeit dargestellt.

### Untersuchungen zu einer Versuchsreihe mit C57Bl6-Wildtypmäusen unter der einmaligen Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG



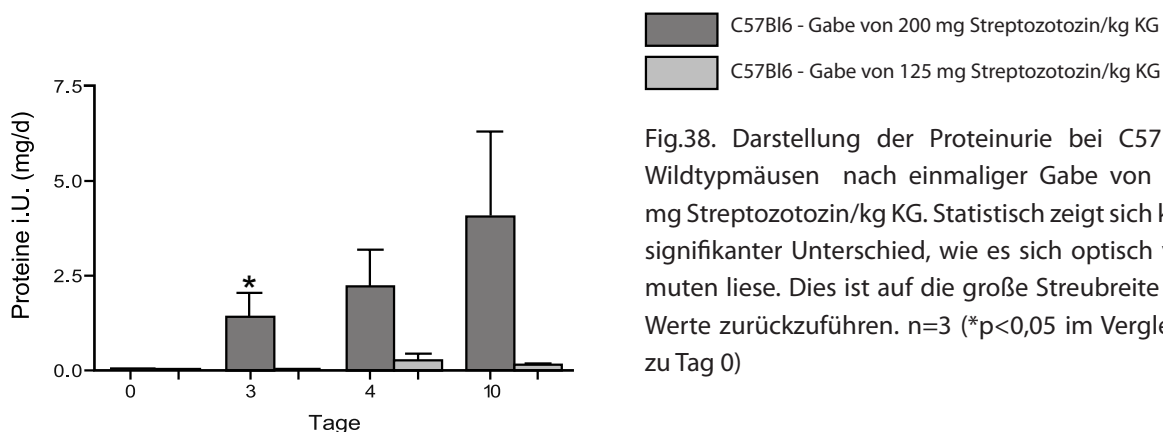
■ C57Bl6 - Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG  
 ■ C57Bl6 - Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG

Fig.36. Darstellung der Blutzuckerverläufe bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach einmaliger Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG. n=3 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0, #p<0,05 im Vergleich zum Hochdosisversuch mit 200 mg Streptozotozin/kg KG)



■ C57Bl6 - Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG  
 ■ C57Bl6 - Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG

Fig.37. Darstellung der Diurese bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach einmaliger Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG. Die normale Diurese einer Maus liegt im Mittel bei 1-2 ml/d. n=3 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0, #p<0,05 im Vergleich zum Hochdosisversuch mit 200 mg Streptozotozin/kg KG)



■ C57Bl6 - Gabe von 200 mg Streptozotozin/kg KG  
 ■ C57Bl6 - Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG

Fig.38. Darstellung der Proteinurie bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach einmaliger Gabe von 125 mg Streptozotozin/kg KG. Statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied, wie es sich optisch vermuten ließe. Dies ist auf die große Streubreite der Werte zurückzuführen. n=3 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

Anhand des Blutzuckers, der Diurese und Proteinurie kann bei einer Dosis von 125 mg Streptozotozin/kg KG bei C57Bl6-Wildtypmäusen von einer sehr langsamen oder einer fehlenden Induktion eines Diabetes mellitus im Vergleich zur Hochdosisapplikation mit 200 mg Streptozotozin/kg KG ausgegangen werden. Für alle Parameter (bei einer Streptozotozindosis von 125 mg/kg KG) zeigt sich gegenüber dem Tag 0 kein signifikanter Anstieg der Konzentrationen. Im Weiteren liegt für den Blutzucker und die Diurese ein signifikant verminderter Anstieg gegenüber einer Induktion mittels einer Streptozotozindosis von 200 mg/kg KG vor.

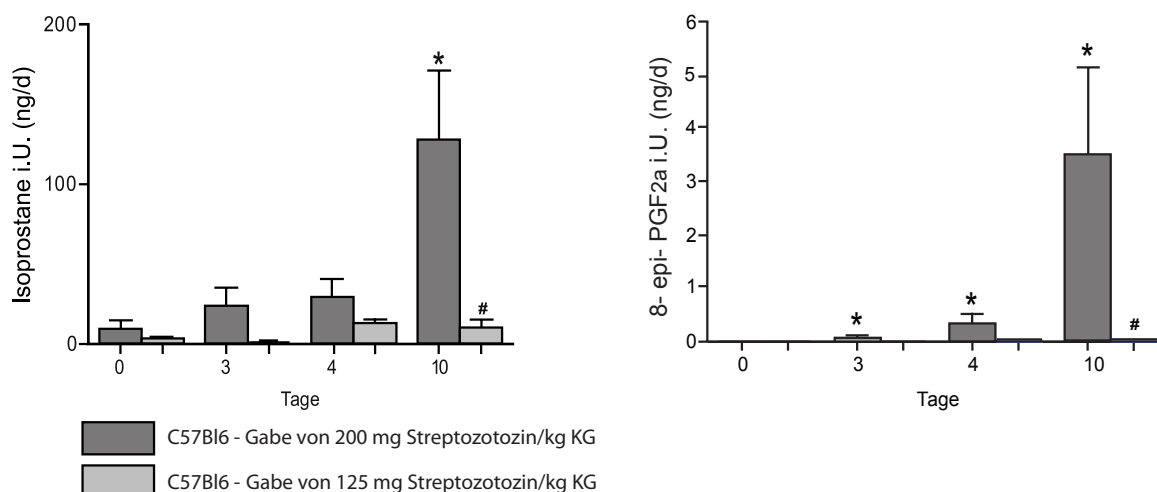


Fig.39. Darstellung der F<sub>2</sub>-Isoprostane und des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> bei C57Bl6-Wildtypmäusen nach einmaliger Gabe von 125 mg Streptozotocin/kg KG. n=3 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0, #p<0,05 im Vergleich zum Hochdosisversuch mit 200 mg Streptozotocin /kg KG).

Aus den oben dargestellten Graphen lässt sich entnehmen, dass es zu einem nicht signifikanten Anstieg der Konzentration der F<sub>2</sub>-Isoprostane, sowie des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> für die C57Bl6-Mäuse kam, welche eine reduzierte Dosis von 125 mg Streptozotocin/kg KG erhielten. Zusätzlich ist eine signifikant verminderte Konzentration für beide Parameter am Tag 10 gegenüber der Konzentration bei der Kontrollgruppe zu messen.

### Untersuchungen an C57Bl6-Wildtypmäusen unter Behandlung mit dem selektiven COX-2-Inhibitor SC236

Um der Frage nachzugehen, ob die beobachtete verstärkte Reaktion der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse auf die hohe Dosis an Streptozotocin durch einen veränderten genetischen Hintergrund oder lediglich durch die fehlende COX-2-Aktivität bedingt ist, wurden C57Bl6-Wildtypmäusen mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC236) behandelt und der Diabetes mellitus mit einer Streptozotocindosis von 200 mg/kg KG induziert. Die erhobenen Daten wurden dann mit den vorliegenden Ergebnissen aus Versuchen an COX-2<sup>-/-</sup>-Tieren unter der Gabe von 200 mg/kg KG verglichen. Es fand zudem ein Vergleich mit den unbehandelten C57Bl6-Tieren statt. Auch im aktuell durchgeführten Versuch mit einer medikamentösen COX-2-Inhibition verstarben die Versuchstiere bereits am dritten oder vierten Untersuchungstag und erreichten somit nicht das Ende des Beobachtungszeitraums von 10 Tagen.

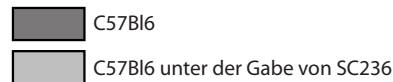
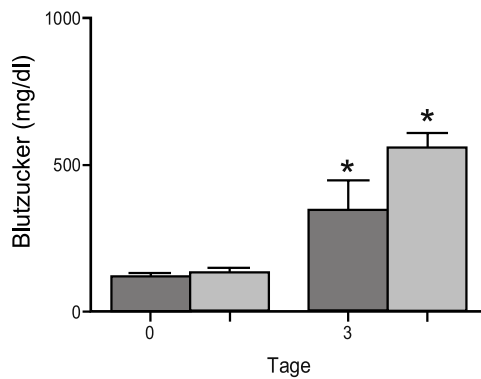


Fig.40. Darstellung der Blutzuckerwerte bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Therapie mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC 236) nach Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotocin/kg KG. n=6 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

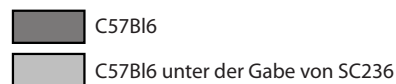
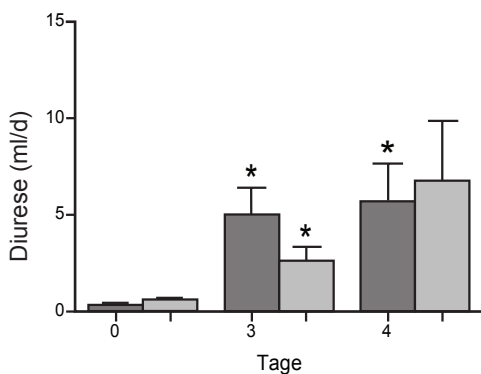


Fig.41. Darstellung der Diurese bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Therapie mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC 236) nach Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotocin/kg KG. n=6 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

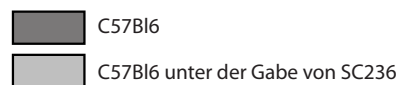
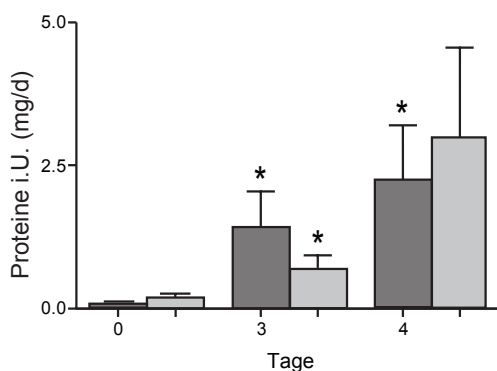


Fig.42. Darstellung der Proteinurie bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Therapie mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC 236) nach Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotocin/kg KG. n=6 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

Sowohl für die Blutzuckerwerte, als auch für die Diurese findet sich im Verlauf ein signifikanter Anstieg der Konzentration und der Menge. Allerdings können nur geringe Unterschiede im Vergleich von C57Bl6-Mäusen zu C57Bl6-Mäusen unter der Gabe von SC236 (einem selektiven COX-2-Inhibitor) beobachtet werden. Für die Gruppe der Mäuse, die den selektiven COX-2-Inhibitor erhielten, gab es in der Auswertung eine sehr große Varianz, so dass sich hier keine signifikanten Anstiege ergaben.

Im Folgenden sind die Verläufe der Konzentrationen für die  $F_2$ -Isoprostane und das 8-epi-PGF<sub>2α</sub> dargestellt. Vor allem für die  $F_2$ -Isoprostane zeigt sich hierbei, dass es am vierten Beobachtungstag zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration in der Gruppe der C57Bl6-Mäuse unter der Gabe von SC236 kommt.

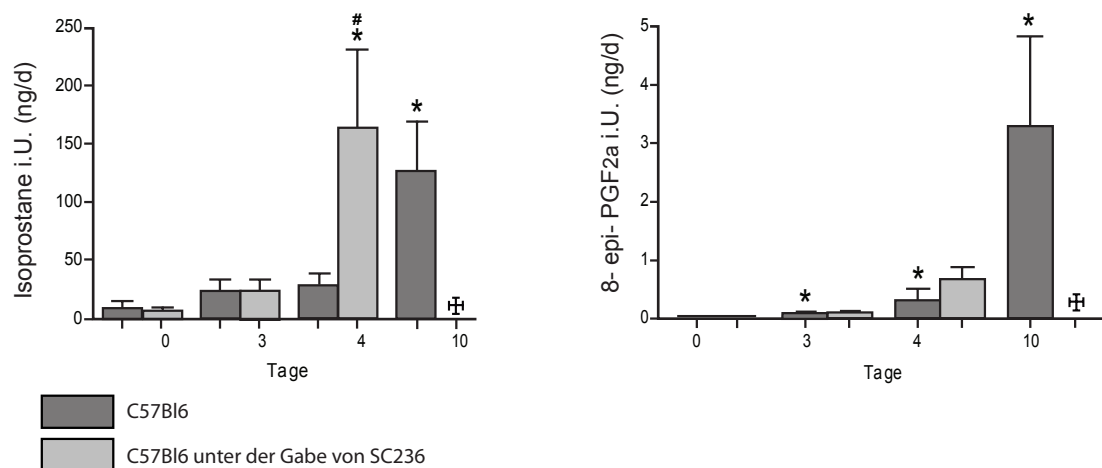


Fig.43. Darstellung der F<sub>2</sub>-Isoprostane und des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Therapie mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC236) nach Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotocin/kg KG. n=6 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0, #p<0,05 im Vergleich zum Hochdosisversuch mit 200 mg Streptozotocin/kg KG), † Tiere verstorben

Nach medikamentöser COX-2-Inhibition bei Wildtypmäusen lässt sich analog zu den COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen eine verminderte Lebensdauer, sowie ein deutlicher Anstieg der Diurese und des Blutzuckers erkennen. Bei der Darstellung der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier zeigt sich für die Gruppe der Mäuse, die einen selektiven COX-2-Inhibitor erhielten, dieselben Ergebnisse, wie schon für die COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse. Es überlebten nur 20% den Beobachtungszeitraum.

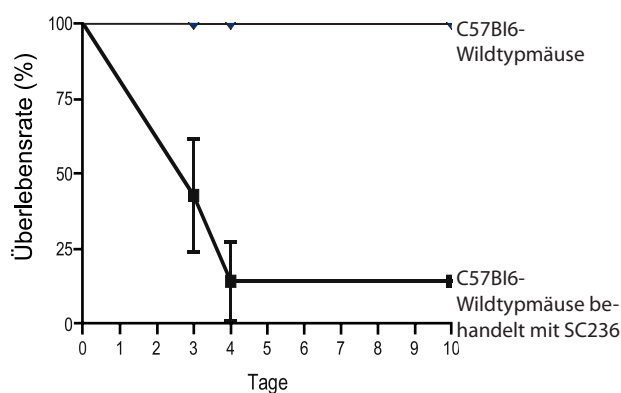
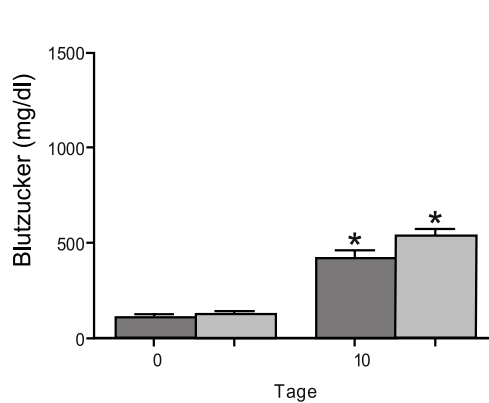


Fig.44. Darstellung der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier von C57Bl6-Wildtypmäusen und C57Bl6-Mäusen, die mit dem selektiven COX-2-Inhibitor SC236 behandelt wurden.

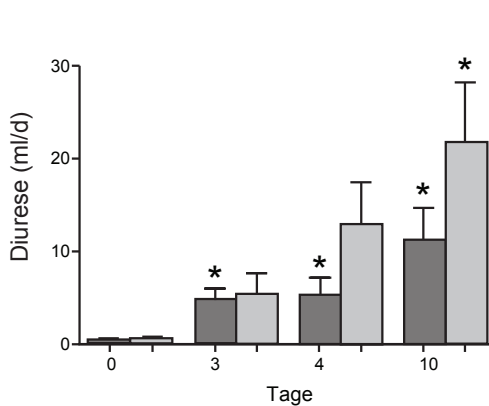
## Effekte des Antioxidans Tempol

Um der Frage nachzugehen, inwiefern die Bildung der Isoprostane durch Radikale bedingt ist, wurde ein Versuch unter der Gabe des Radikalfängers Tempol durchgeführt.



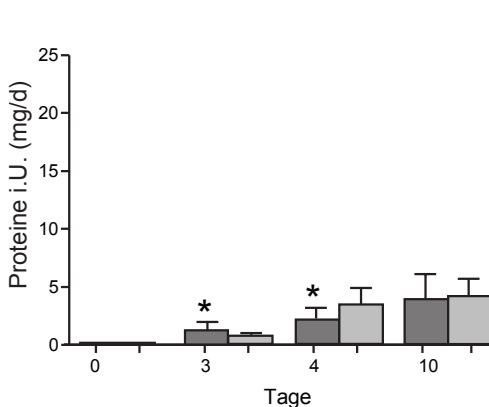
■ C57Bl6  
■ C57Bl6 unter der Gabe von Tempol

Fig.45. Darstellung der Blutzucker bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter Gabe des Antioxidans Tempol nach der Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotolin/kg KG. Die Tiere erhielten bereits 3 Tage vor Untersuchungsbeginn das Medikament über die Tränke. n=5 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)



■ C57Bl6  
■ C57Bl6 unter der Gabe von Tempol

Fig.46. Darstellung der Diurese bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter Gabe des Antioxidans Tempol nach der Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotolin/kg KG. Die Tiere erhielten bereits 3 Tage vor Untersuchungsbeginn das Medikament über die Tränke. n=5 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)



■ C57Bl6  
■ C57Bl6 unter der Gabe von Tempol

Fig.47. Darstellung der Proteinurie bei C57Bl6-Wildtypmäusen unter Gabe des Antioxidans Tempol nach der Induktion eines Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotolin/kg KG. Die Tiere erhielten bereits 3 Tage vor Untersuchungsbeginn das Medikament über die Tränke. n=5 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0)

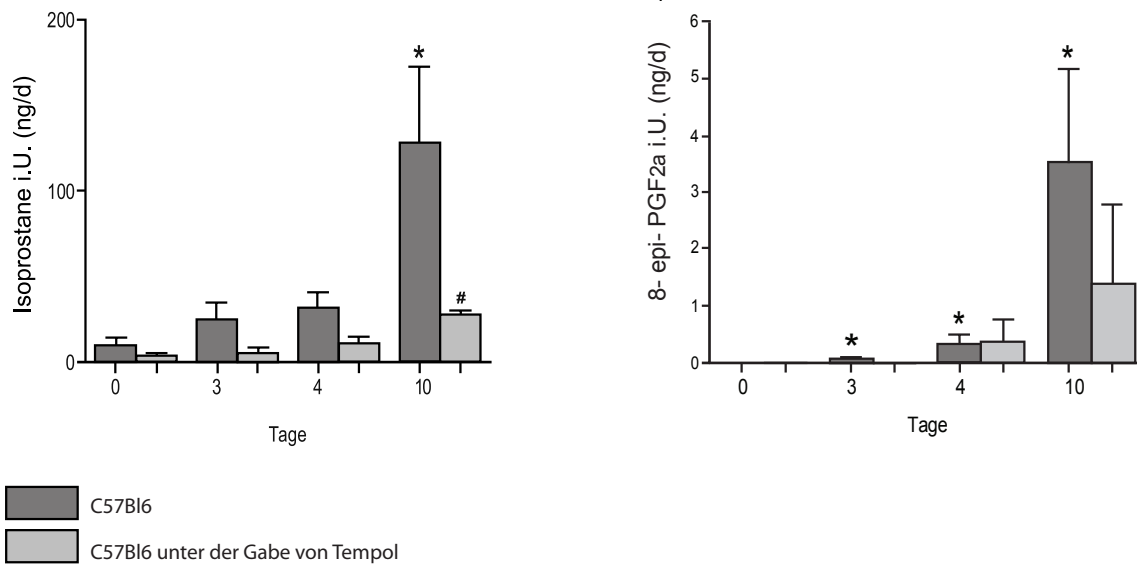


Fig.48. Darstellung der Exkretionsraten der  $F_2$ -Isoprostane und von 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  bei Wildtypmäusen (C57Bl6) im Vergleich zu Wildtypmäusen unter der kontinuierlichen Gabe des Antioxidans Tempol. n=5 (\*p<0,05 im Vergleich zu Tag 0, #p<0,05 im Vergleich zum Hochdosisversuch mit 200 mg Streptozotocin /kg KG)

Unter der Gabe von Tempol kann keine signifikante Änderung der Konzentration des Blutzuckers und der Proteinurie, sowie der Menge der Diurese, beobachtet werden. Allerdings kann für die  $F_2$ -Isoprostane, jedoch nicht für das 8-epi-PGE $_{2\alpha}$ , eine deutliche Reduktion der Konzentration vor allem am Beobachtungstag 10 gezeigt werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass für das 8-epi-PGE $_{2\alpha}$  vor allem an Tag 10 eine große Schwankungsbreite der Werte vorliegt.

### Einfluss von Typ 1 Diabetes auf Malondialdehyd

In allen Versuchsanordnungen wurde auch das Malondialdehyd (MDA) gemessen. Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass es unter der Behandlung mit Streptozotocin in einer Dosis von 200 mg/kg KG zu einem Anstieg dieses Parameters kommt, wie es auch schon für die  $F_2$ -Isoprostane und das 8-epi-PGE $_{2\alpha}$  beobachtet werden konnte. Außerdem ist unter der Therapie mit dem Radikalfänger Tempol eine Reduktion der Konzentration von MDA, nicht jedoch die völlige Normalisierung, festzustellen.

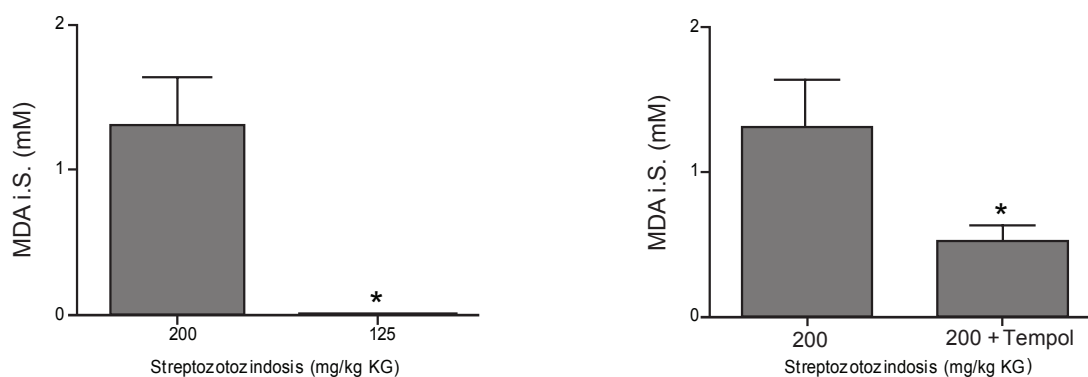


Fig.49. Darstellung von Malondialdehyd im Tierversuch bei Typ 1 Diabetes.

Graph 1 zeigt die Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Tieren. ( $p=0,016$ )

Graph 2 zeigt die Wirkung von Tempol auf die Konzentration von MDA bei an Typ 1 Diabetes erkrankten Mäusen (hier Diabetesinduktion mit 200 mg Streptozotocin/kg KG). ( $p=0,0089$ )

Bei allen Vergleichsgruppen kam es zu einem erheblichen Anstieg in der MDA-Konzentration im Vergleich zu der Gruppe (C57Bl6-Wildtyp (Induktionsdosis: 125 mg Streptozotocin/kg KG)), welche aufgrund der geringen Induktionsdosis keinen Diabetes mellitus entwickelte. Für gesunde Mäuse wurden keine Werte erhoben.

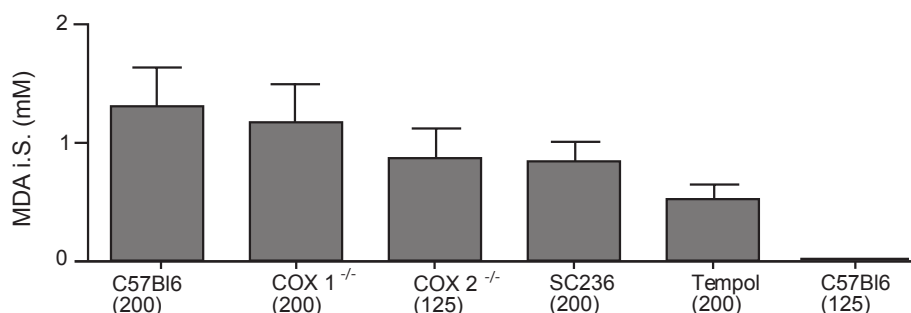


Fig.50. Darstellung der Werte für MDA für alle Untersuchungsgruppen (Es ist hier zu beachten, dass alle Untersuchungen mit einer Induktionsdosis von 200 mg/kg KG durchgeführt wurden. Eine Ausnahme stellte die Gruppe der COX-2<sup>-/-</sup>-Tiere dar, bei denen eine Induktion mit der Dosis von 125 mg/kg KG erfolgte. Für die Gruppe der Wildtypmäuse unter der Therapie mit SC236, wurden lediglich 4 Tage beobachtet, da die Tiere nicht den 10. Beobachtungstag erreichten).

Es wurden Korrelationskurven für die verschiedenen Versuchsmodelle erstellt. Aufgezeigt sind hier beispielhaft nur die Korrelationen zu den F<sub>2</sub>-Isoprostanen.

Zusammenfassend wird keine Korrelation zwischen den beiden Parametern, F<sub>2</sub>-Isoprostane und dem MDA, für die meisten der Untersuchungsreihen (C57Bl6-Wildtypmäuse, C57Bl6-Wildtypmäuse unter der Gabe von Tempol, COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse) beobachtet. Allerdings findet sich für zwei der Mausgruppen (COX-1<sup>-/-</sup>-Mäuse, C57Bl6-Wildtypmäuse unter der Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors SC236) für das F<sub>2</sub>-Isoprostane eine signifikante Korrelation zu MDA.



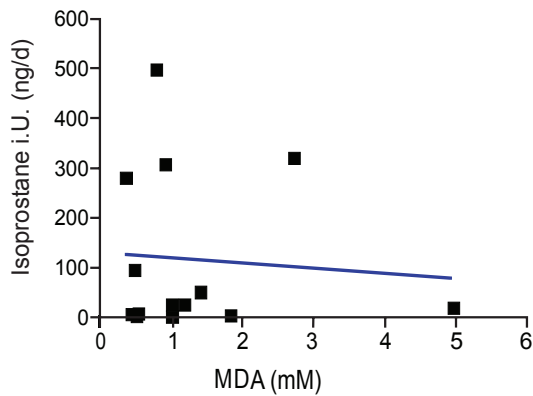


Fig.51. Hochdosisversuch an C57Bl6-Wildtypmäusen. Punkteschar zur Korrelation zwischen  $F_2$ -Isoprostanen und MDA. ( $r^2=0,006$ ,  $p>0,05$ )

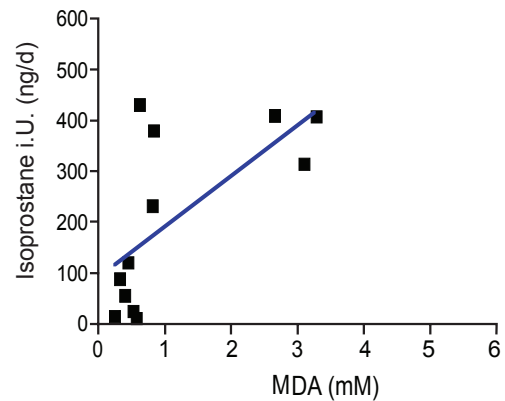


Fig.52. Hochdosisversuch an COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Punkteschar zur Korrelation zwischen  $F_2$ -Isoprostanen und MDA. ( $r^2=0,044$ ,  $p<0,05$ )

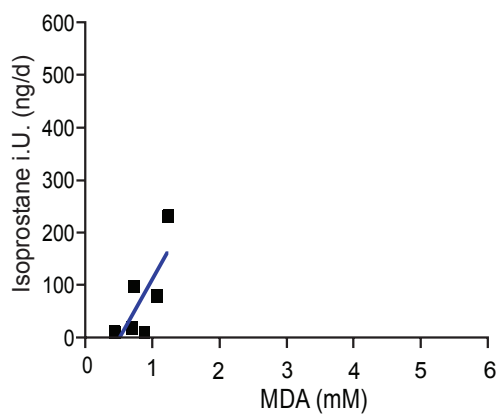


Fig.53. Hochdosisversuch an C57Bl6-Wildtypmäusen unter Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors SC236. Punkteschar zur Korrelation zwischen  $F_2$ -Isoprostanen und MDA. ( $r^2=0,56$ ,  $p<0,05$ )

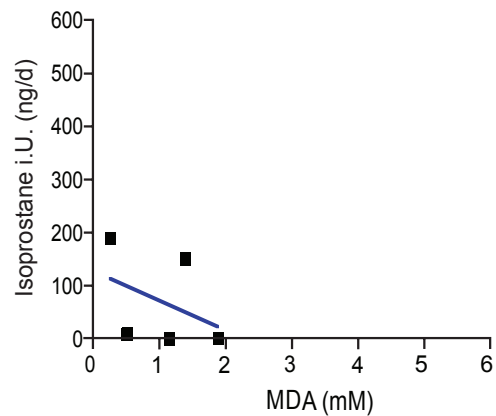


Fig.54. Hochdosisversuch an COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Punkteschar zur Korrelation zwischen  $F_2$ -Isoprostanen und MDA. ( $r^2=0,162$ ,  $p>0,05$ )

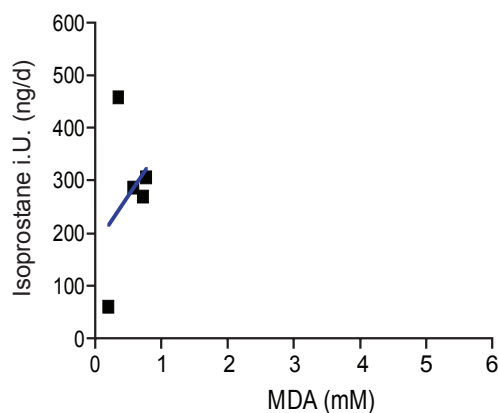


Fig.55. Hochdosisversuch an C57Bl6-Wildtypmäusen unter der Gabe von Tempol. Punkteschar zur Korrelation zwischen  $F_2$ -Isoprostanen und MDA. ( $r^2=0,105$ ,  $p>0,05$ )

## IV. Diskussion

### IV. 1. Klinischer Teil

Mit der schnell fortschreitenden Entwicklung der Therapie des Diabetes mellitus kam es zu einer Abnahme der Todesraten durch akute Komplikationen. Jedoch nimmt die Mortalität und Morbidität durch chronische Komplikationen stetig zu. Zu den Hauptkomplikationen sowohl des Typ 1 Diabetes als auch des Typ 2 Diabetes zählen Mikro- und Makroangiopathien. Das Auftreten der vaskulären Komplikationen korreliert zum einen mit der Dauer der Erkrankung, zum anderen mit der Güte der Blutzuckereinstellung. Obwohl Kinder und Jugendliche meist noch keine Komplikationen aufweisen, kommt es auch schon bei ihnen bereits in der Kindheit zu Veränderungen an den Endothelien. Es ist bekannt, dass diese Veränderungen den Beginn für die Vaskulopathien darstellen<sup>47,116</sup>. Zu den Spätfolgen des Diabetes mellitus gehören durch Vaskulopathien hervorgerufene Nephropathien, Polyneuropathien und Retinopathien (gemessene Parameter im klinischen Alltag: Proteine, im Speziellen (Mikro-)Albumine im Urin, Parästhesie, Achillessehnenreflex, Nervenleitgeschwindigkeit und Beurteilung des Augenhintergrunds). Oxidativer Stress könnte möglicherweise für die Gefäßveränderungen und für jene Schäden an den genannten Organen ursächlich sein. Durch eine exzessive Produktion von freien Radikalen und einer Verminderung der endogenen antioxidativen Kapazität durch Hyperglycämie soll es zur Schädigung von Gewebe, u.a. von Endothelien, kommen<sup>47</sup>. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, kommt es vor allem durch Autooxidation von Glucose, nicht-enzymatischer Glycosilierung, durch Bildung von AGEs (advanced glycation end product) und Aktivierung der Proteinkinase C bei bestehender Hyperglycämie zu einer vermehrten Produktion von freien Radikalen.

#### Erhöhung der Parameter für oxidativen Stress

Aktuell gibt es verschiedenste Möglichkeiten, die Lipidoxidation zu messen. Als bester Parameter in vivo werden im Moment die  $F_2$ -Isoprostane angesehen<sup>100,118</sup>. Eine weitere oft angewandte Marker-substanz ist das MDA.

Meine Untersuchungen sollten klären, ob die Erkrankung an einem Typ 1 Diabetes zu einer Änderung in der Konzentration der beiden oben genannten Parameter führt. Hierbei zeigte sich, dass bei den an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern eine erhöhte Konzentration, sowohl für die untersuchten  $F_2$ -Isoprostane ( $F_2$ -Isoprostane und 8-epi-PGF<sub>2α</sub>), als auch für das Malondialdehyd (MDA), im Vergleich zu gesunden Kindern gemessen werden konnte.

Bereits in frühen Stadien der Erkrankung kommt es zu einem erhöhten Maß an oxidativem Stress<sup>33</sup>. Verantwortlich hierfür wurde die bestehende Hyperglycämie gemacht. Ergebnisse mehrerer anderer Studien ergaben ebenfalls eine Erhöhung der Isoprostane und das bereits kurz nach der Diagnosestellung<sup>24,29,90</sup>. Die betreffenden Studien zeigten auch, dass zum Zeitpunkt der Diagnose ein verminderter antioxidativer Status vorlag.

Es liegt allerdings auch eine Studie vor, in der es keine signifikanten Unterschiede für die Konzentration der Parameter für oxidativen Stress - unter anderem  $F_2$ -Isoprostane - zwischen an Typ 1 Diabetes erkrankten und gesunden Kindern gibt<sup>42</sup>. Dies führten die Autoren auf eine möglicherweise erfolgreiche Behandlung der kranken Kinder mit Insulin zurück, da eine gute Einstellung der Blutzuckerwerte mit einer Reduktion der Konzentration der Isoprostane einhergeht<sup>24</sup>.

Zusammenfassend unterstreichen meine Befunde die These, dass die Redoxmarker  $F_2$ -Isoprostane, 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und MDA bei Typ 1 Diabetespatienten verstärkt gebildet werden.

### Korrelation zu klinischen Parametern

Bei der Überprüfung der Validität eines Markers (in diesem Fall der  $F_2$ -Isoprostane) ist es wünschenswert, dass eine Korrelation zu der Dauer der Erkrankung, oder zu laborchemischen Parametern, wie dem aktuellen Blutzucker, dem HbA<sub>1c</sub>, sowie zu dem zusätzlich erhobenen älteren Parameter für oxidativen Stress, dem MDA, vorliegt. Meine Arbeit gelangt zu dem Ergebnis, dass für 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und MDA keine Korrelation zu den oben genannten Laborparametern und der Dauer der Erkrankung besteht. Für die  $F_2$ -Isoprostane zeigt sich ausschließlich eine signifikante Korrelation zum HbA<sub>1c</sub>, nicht aber zum aktuellen Blutzucker und auch nicht zu der - graphisch in der Arbeit nicht dargestellten - Dauer der Erkrankung.

Andere Studien ergaben weder für die  $F_2$ -Isoprostane noch für MDA eine signifikante Korrelation zur Güte der Blutzuckereinstellung, dem HbA<sub>1c</sub><sup>31,34,95</sup>. Demgegenüber wiesen Davi et al.<sup>24</sup> eine Korrelation zwischen einer sehr guten Blutzuckereinstellung und der Konzentration von MDA und 8-epi-PGF<sub>2α</sub> nach. Auch Rytter et al.<sup>133</sup> beobachteten eine positive Korrelation zwischen HbA<sub>1c</sub> bzw. dem aktuellen Blutzucker und 8-epi-PGF<sub>2α</sub>. Hinsichtlich des MDA zeigte eine weitere Untersuchungsreihe einen positiven Zusammenhang zwischen der Dauer der Erkrankung und erhöhten Parametern für oxidativen Stress<sup>106</sup>. Die vorliegenden Ergebnisse sind insofern widersprüchlich. Jedenfalls zeigt sich in meinen Untersuchungen eine signifikante Korrelation für die  $F_2$ -Isoprostane zum HbA<sub>1c</sub>, nicht aber zu anderen Parametern. Eine Korrelation zum aktuellen Blutzucker bei gleichzeitiger Behandlung der Erkrankung dürfte deshalb nicht zu erwarten sein, da durch kurzfristige Änderungen des Blutzuckers möglicherweise keine beschleunigte / reduzierte Lipidoxidation erfolgt.

Nachvollziehbarer erscheint - wie meine Ergebnisse zeigen - eine Korrelation zur Güte der Blutzuckereinstellung, dem HbA<sub>1c</sub>. Dieser Parameter bildet Blutzuckerwerte über 2 Monate ab und unterliegt insoweit keinen kurzfristigen Schwankungen.

Die fehlende Korrelation der F<sub>2</sub>-Isoprostane mit der Dauer der Erkrankung kann damit erklärt werden, dass die Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane von einer guten Blutzuckereinstellung und damit von der Güte der Behandlung abhängig ist. Die Dauer der Erkrankung scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In meinen Untersuchungen lag bereits bei fünf Kindern eine Mikroalbuminurie (> 20mg/ 24h) als Ausdruck einer Nierenschädigung vor. Es erfolgte allerdings keine Unterteilung der Patienten in Subgruppen, so dass keine mögliche Korrelation zwischen den bereits klinisch manifesten Komplikationen und der Höhe der Parameter auszumachen war. Hata et al.<sup>47</sup> zeigten, dass eine signifikante Erhöhung des MDA bei Vorliegen einer Mikroalbuminurie zu beobachten ist. Da die Mikroalbuminurie eine pathologische Veränderung der Endothelbarriere in den Nieren darstellt, kann aufgrund dieser Feststellung davon ausgegangen werden, dass oxidativer Stress an der Entstehung dieser gerade sichtbar werdenden Veränderungen im Rahmen der Mikrovasculopathie beteiligt ist. Auch andere Studien unterstreichen die These, dass das Vorliegen von erhöhten Konzentrationen von F<sub>2</sub>-Isoprostanen und MDA bei Diabetikern mit der Entwicklung von Komplikationen in Verbindung steht<sup>48,87,123</sup>. Rashidi et al.<sup>124</sup> zeigten, dass die Konzentration von MDA bei bereits bestehenden Komplikationen, in diesem Falle einer Nephropathie, höher ist, als bei Patienten mit Diabetes mellitus ohne Komplikationen. Inwieweit F<sub>2</sub>-Isoprostane beziehungsweise oxidativer Stress eine Rolle im Rahmen der Pathogenese der Folgeschäden spielen oder nur ein Epiphänomen darstellen, bleibt zu diskutieren.

### Antioxidativer Status und antioxidative Therapie

Im Zusammenhang mit oxidativem Stress spielt der antioxidative Status eine wichtige Rolle. Normalerweise findet man eine Vielzahl an Antioxidantien im Körper, die biologische Membranen vor oxidativer Schädigung schützen. Hier sind zum einen die enzymatischen (intrazellulären) Antioxidantien zu nennen, zu welchen die Superoxiddismutase (SOD), die Gluthationperoxidase und die Katalase zählen. Zum anderen gibt es die nicht-enzymatischen Antioxidantien, wie Vitamin A, E und C. Der antioxidative Status ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, ich möchte aber kurz auf diesen Aspekt eingehen.

In bisherigen Studien liesen sich folgende Erkenntnisse gewinnen: Teilweise trägt nicht nur eine Zunahme der freien Radikale zum Ungleichgewicht im Redox-System bei, sondern auch eine Abnahme der endogenen antioxidativen Kapazität, was am ehesten durch eine Hyperfiltration in der

Niere während der initialen Phase des Diabetes mellitus zu erklären ist<sup>90,123</sup>.

Die Ergebnisse von zwei großen Studien bei erwachsenen Patienten weichen bezüglich einer ergänzenden Therapie mit Antioxidantien deutlich voneinander ab; in der CHAOS-Studie konnte ein klinischer Benefit durch die Therapie mit Vitamin E gefunden werden<sup>93</sup>. Es kam zu einer Reduktion der nicht-tödlichen Myokardinfarkte. Hingegen zeigte sich in der HOPE-Studie kein positiver Effekt durch die Gabe von Vitamin E<sup>93</sup>. Die genannten Studien werden hier beispielhaft für eine Anzahl weiterer Studien mit vergleichbarem Untersuchungsansatz aufgeführt.

Insgesamt kann mit Blick auf die aktuelle Studienlage eine begründete Empfehlung für oder gegen eine Therapie mit Antioxidantien mangels richtungsweisender Ergebnisse nicht ausgesprochen werden.

## IV.2. Tierexperimenteller Teil

### Konzentrationsverlauf der F<sub>2</sub>-Isoprostane

Um die im klinischen Teil meiner Arbeit beobachteten Ergebnisse besser nachvollziehen zu können, erfolgten weitere Studien am Tiermodell.

Hierbei zeigte sich, dass es nach Induktion eines Diabetes mellitus mittels Streptozotocin bei allen untersuchten Tieren (C57Bl6-Wildtypmäusen, COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen und COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen) zu einem signifikanten Anstieg der F<sub>2</sub>-Isoprostane kommt. Im Verlauf der Beobachtung und mit zunehmender Dauer der unbehandelten Erkrankung nimmt die Konzentration dieser untersuchten Parameter (PGE<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>-Isoprostane und 8-epi-PGF<sub>2α</sub>) zu. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass mit einem Anstieg der Blutglucose und einer fortwährenden Erkrankung ohne Therapie, die Schädigung durch oxidativen Stress, gemessen an der Lipidoxidation, zunimmt. Auch in der Literatur haben verschiedene Forschergruppen eine erhöhte Konzentration der Isoprostane im Rahmen eines Diabetes beobachtet<sup>96,109</sup>. Meine Ergebnisse fügen sich damit in den aktuellen Forschungsstand ein. Durch die mehrmalige Gabe einer niedrigen Dosis an Streptozotocin ließ sich in meinen Untersuchungen kein Diabetes mellitus induzieren. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Möglicherweise müssten bei diesem Diabetes-Modell spätere Zeitpunkte untersucht werden, da bei mehrmaliger niedrigdosierter Streptozotocingabe am ehesten autoimmune Effekte für die Auslösung des Diabetes mellitus ursächlich zu sein scheinen<sup>73</sup>.

Darüber hinaus beobachtete ich ein frühes Versterben der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse, was im folgenden Kapitel zum Einfluss der COX-2-Defizienz auf das Studienmodell erörtert wird. Diesbezüglich stellt sich

ergänzend die Frage, ob die Isoenzyme COX-1 und COX-2 bei der Erkrankung des Diabetes mellitus und bei der Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane eine Rolle spielen.

### Einfluss von COX-1<sup>-/-</sup> auf das Studienmodell

In einer auf diese Fragestellung ausgerichteten Versuchsreihe untersuchte ich die Bedeutung von COX-1 anhand von COX-1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Grundsätzlich diente dieser Ansatz, ebenso wie der im Weiteren beschriebene Versuch an COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen, zur Klärung der Frage, inwieweit die beiden Isoenzyme COX-1 und COX-2 eine Rolle im Rahmen der Entstehung der F<sub>2</sub>-Isoprostane spielen. In der dazu vorliegenden Literatur werden zwei Hypothesen für die Entstehung der F<sub>2</sub>-Isoprostane diskutiert: zum einen ein enzymvermittelter Weg über die Cyclooxygenase<sup>121</sup>, welcher von einer Minderheit vertreten wird, zum anderen eine durch freie Radikale vermittelte Entstehung<sup>99,100</sup>.

Im hier gezeigten Versuch erfolgte die Induktion des Diabetes mellitus mit 200 mg Streptozotocin/kg KG, entsprechend den Untersuchungen an den C57Bl6-Wildtypmäusen. Die gemessenen laborchemischen Parameter (Diurese, Proteinurie, Blutglucose) und die Parameter für den oxidativen Stress (MDA, F<sub>2</sub>-Isoprostane) zeigten im Verlauf ähnliche Konzentrationen wie bei den als Kontrollgruppe dienenden C57Bl6-Mäusen.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen vergleichbarer Studien. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigten ein primäres Vorkommen von COX-1 und COX-2 in den Langerhanszellen. Die Produktion von PGE<sub>2</sub> in den Inselzellen des Pankreas ließ sich durch eine COX-1-Inhibition im Gegensatz zur COX-2-Inhibition nicht beeinflussen<sup>35</sup>. Insbesondere wird COX-2, da dieses vor allem bei inflammatorischen Prozessen hochreguliert ist, im Vergleich zu COX-1 eine übergeordnete Funktion in der Bildung der 8-iso-PGF<sub>2α</sub> zugeschrieben<sup>70</sup>. Hierzu im Gegensatz zeigte Favreau eine COX-1-abhängige Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane, insbesondere des 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Diese Forschergruppe konnte hingegen keinen Einfluss von COX-2 auf die Konzentration der Isoprostane beobachten. Untersucht wurde in Ihrem Fall anhand einer renalen Ischämie und nicht im Rahmen des Diabetes mellitus<sup>32</sup>.

Daher ist davon auszugehen, dass das Isoenzym COX-1 für den Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus wahrscheinlich keine nennenswerte Rolle spielt. Auch übt die COX-1-Defizienz nach meinen Ergebnissen keinen Einfluss auf die Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane aus.

### Der Einfluss von COX-2<sup>-/-</sup> auf das Studienmodell

Für die Gruppe der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse beobachtete ich ein vorzeitiges Versterben, so dass nur 20%

das Untersuchungsende erreichten; im Schnitt verstarben die Mäuse bereits am 3. Tag der Untersuchung. Bei diesen Mäusen konnte bereits mit geringen Streptozotizindosen (100-150 mg/kg KG) ein Diabetes mellitus induziert werden. Bemerkenswerterweise waren die Blutzuckerspiegel bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse deutlich höher (ca. 1000 mg/dl) als bei Wildtypmäusen mit der Standarddosis von 200 mg/kg KG (ca. 450 mg/dl). Im Gegensatz hierzu konnten diese niedrigen Dosen bei C57Bl6-Wildtypmäusen keine Blutzuckererhöhung auslösen, so dass hier keine rasche Entwicklung eines Diabetes mellitus vorlag.

Vor diesem Hintergrund muss daher davon ausgegangen werden, dass bei COX-2-Defizienz Streptozotizin eine erhöhte Toxizität ausübt.

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die medikamentöse Behandlung von C57Bl6-Wildtypmäusen mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC236). Hierdurch erhoffte ich mir Erkenntnisse darüber zu erlangen, inwieweit das Fehlen von COX-2 von Geburt an (am Modell der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse), und hiermit ggf. vor Untersuchungsbeginn vorliegende organische Veränderungen, eine Rolle spielen. Es zeigte sich zwischen diesen beiden Gruppen kein Unterschied im Hinblick auf das Ess-/Trinkverhalten, den Blutzucker, die Diurese, die Proteinurie und die F<sub>2</sub>-Isoprostane. Auch die Mäuse dieser Untersuchungsgruppe verstarben schon vorzeitig vor Erreichen des Beobachtungsendes. Daher ist davon auszugehen, dass der Grund des vorzeitigen Versterbens nicht in situationsbedingten Gegebenheiten oder in einer angeborenen Organveränderung, sondern in einem pathophysiologischen endogenen Vorgang zu suchen ist.

Um die abweichenden Versuchsergebnisse einordnen zu können, werden nachfolgend ähnlich konzipierte Studien vorgestellt.

Für COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden eine reduzierte Lebenserwartung<sup>98</sup>, kardiale Fibrose, Infertilität des weiblichen Geschlechts<sup>28</sup> sowie renale Dysplasien beschrieben. Morham et al.<sup>98</sup> wiesen histologisch nach, dass bei diesen Tieren eine Verschmälerung des Kortex der Niere, Verminderung der Anzahl der Glomeruli, Veränderungen der Tubuli (Atrophie, Dilatation,...) und eine interstitielle Fibrose vorlagen. Für das Ausmaß der Veränderung bestand eine Altersabhängigkeit, d.h. dass mit zunehmendem Alter die Veränderungen an den Nieren bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen zunahmen. Im Alter von 3 Tagen zeigten sich noch keine histologischen Veränderungen, die Nierenfunktion war normal. Die vollständige und abschließende Entwicklung der Nieren bei diesen Mäusen vollzog sich postpartal in den ersten Lebenswochen. Die betreffenden Veränderungen manifestierten sich vor allem ab einem Alter von 8 Wochen.

Meine Versuchsreihe wurde mit Tieren in einem Alter von 6-8 Wochen durchgeführt. Daher können zumindest teilweise die beobachteten Veränderungen in den Versuchsserien mit COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Versuchsserien mit Wildtypmäusen durch die unterschiedliche Genetik erklärt wer-

den. Diese Annahme wurde dann aber durch eine weitere Versuchsanordnung nämlich den medikamentösen Inhibitoren des COX-2 während des Versuchs, wie bereits in den einleitenden Sätzen dieses Abschnitts beschrieben, widerlegt. Die Behandlung mit einem selektiven COX-2-Inhibitor führte zu den gleichen Versuchsbeobachtungen. Bei diesen Tieren lag dementsprechend keine genetisch bedingte Organveränderung vor, so dass diese nicht als Ursache des vorzeitigen Versterbens und als Ursache für die erhöhte Toxizität des Streptozotizins angesehen werden kann.

Nach einer anderen Studie<sup>109</sup> scheint der COX-2-Inhibitor zu einer Verlangsamung der Entwicklung einer Proteinurie zu führen. Das heißt, dass dieser Inhibitor nach diesen Ergebnissen offenbar nephroprotektiv wirkt. Unter Berücksichtigung beider Aspekte kommt man zu dem Schluss, dass genetische Faktoren nicht die entscheidenden sein können. Auch scheint die Niere, da der COX-2-Inhibitor hier eher einen positiven Einfluss hat, nicht das ursächliche Organ für die hohe Toxizität von Streptozotizin bei COX-2-defizienten Mäusen zu sein.

In der dieser Arbeit angeschlossenen Untersuchung wurde nachgewiesen, dass die Toxizität des Streptozotizins und damit die verminderte Lebensdauer der Tiere nicht durch eine verlängerte Halbwertszeit bedingt ist<sup>151</sup>. Insoweit ist anzunehmen, dass andere Mechanismen zu einer erhöhten Toxizität im Pankreas führten.

Weiterführende Ergebnisse wurden - basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit - durch eine von Prof. Dr. Nüsing betreuten Arbeitsgruppe erhoben. Ein möglicher Erklärungsansatz ist demnach das Vorkommen oder Fehlen der Cyclooxygenase selbst. Beide Coxenzyme (COX-1 und COX-2) werden im Pankreas exprimiert, hierbei kommt COX-2 vor allem in den Langerhanszellen, dem Produktionsort von Insulin, vor<sup>35,130</sup>. Wir konnten zudem beobachten, dass durch die Gabe von Streptozotizin normalerweise die Expression von COX-2 und damit die Bildung von PGE<sub>2</sub> gesteigert werden konnte. Bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen, und auch bei Mäusen, die einen selektiven COX-2-Inhibitor erhielten, zeigte sich hingegen eine deutlich verminderte Bildung von PGE<sub>2</sub>. Die  $\beta$ -Zellen wurden wahrscheinlich durch die verminderte Konzentration an PGE<sub>2</sub> durch Streptozotizin fast vollständig zerstört. Folge war eine Hypoinsulinämie mit konsekutiver Hyperglycämie, was die verminderte Lebenszeit erklärt<sup>151</sup>. Bei Wildtypmäusen kam es nach Induktion des Diabetes mellitus hingegen nur zu einer Reduktion des Insulins um ca. 50% und nicht zu einem fast vollständigen Fehlen von Insulin wie im Falle der COX-2<sup>-/-</sup>-Mäuse<sup>150</sup>. Daher ist davon auszugehen, dass das PGE<sub>2</sub> eine protektive Rolle einnimmt. Die beiden Prostaglandinrezeptoren PTGER<sub>2</sub> und PTGER<sub>4</sub> sind an der PGE<sub>2</sub>-vermittelten protektiven Wirkung gegenüber Streptozotizins an den  $\beta$ -Zellen mutmaßlich beteiligt<sup>151</sup>.



### Möglichkeit einer COX-getriggerten Entstehung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub>

Bei COX-2<sup>-/-</sup>-Mäusen, die mit einer reduzierten Streptozotозindosis behandelt wurden, konnten im Vergleich zu den Wildtypmäusen vergleichbare Konzentrationen der F<sub>2</sub>-Isoprostane gemessen werden. Allerdings zeigen meine Messungen, dass die Konzentration für 8-epi-PGF<sub>2α</sub> signifikant geringer war, als in der Vergleichsgruppe. Bei den C57Bl6-Mäusen konnten unter der Gabe eines selektiven COX-2-Inhibitors diese Ergebnisse ebenfalls beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass die Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane und des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> über unterschiedliche Wege verläuft. Die Ergebnisse erhärten damit die These, dass die Isoprostanuntergruppe 8-epi-PGF<sub>2α</sub> gänzlich oder zumindest überwiegend über einen COX-2-abhängigen Weg entsteht.

Hiervon gehen auch Pratico et al.<sup>119</sup> aus, welche behaupten, dass es COX-1-abhängig durch eine Aktivierung der Blutplättchen, sowie COX-2-abhängig in Monozyten zur Bildung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> aus der Arachidonsäure kommt. Diese Forschergruppe beobachtete zudem, dass die Gabe von Aspirin® zu einer Verminderung der 8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration führt. Es ist daher anzunehmen, dass die Bildung dieser Isoprostanuntergruppe über einen COX-2-abhängigen Weg abläuft. Ähnlich Ergebnisse erbrachte eine Studie unserer Klinik, die auch eine cyclooxygenase-abhängige Bildung des Isoprostans 8-epi-PGF<sub>2α</sub> zeigte<sup>69</sup>.

Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen fanden Davi et al.<sup>24</sup> keine Hemmung der 8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Synthese nach Gabe der COX-unspezifischen Inhibitoren Aspirin® und Ibuprofen®. Mehrere Studien zeigten ebenso eine COX-unabhängige Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane, unter anderem auch des 8-epi-PGF<sub>2α</sub><sup>2,98,99,154</sup>.

Fraglich ist aufgrund der Studienlage daher, ob 8-epi-PGF<sub>2α</sub> als valider Marker eingesetzt werden kann, wenn eine mögliche COX-2-abhängige Entstehung des Markers vorliegt und der Patient / Proband zusätzlich COX-Inhibitoren, wie zum Beispiel Aspirin®, einnimmt.

### Korrelationen von F<sub>2</sub>-Isoprostanen zu MDA

Beim Vorliegen eines Diabetes mellitus zeigt sich in meinen Untersuchungen sowohl eine Erhöhung der F<sub>2</sub>-Isoprostane, als auch des MDAs. Eine Korrelation zwischen den beiden genannten Parametern konnte nur für die COX-1<sup>-/-</sup>-Mäuse und die C57Bl6-Wildtypmäuse unter der Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors SC236 gefunden werden. Für die restlichen untersuchten Mauspopulationen zeigte sich keine signifikante Korrelation zu MDA. Ein Grund hierfür lässt sich meines Erachtens nicht finden. Für alle Gruppen lag für das 8-epi-PGF<sub>2α</sub> keine Korrelation zu MDA vor. Ähnliche vergleichende Untersuchungen konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Eine Studie von Feillet-Coudray et al.<sup>33</sup> ergab eine Erhöhung des MDA im Plasma, sowie eine Erhöhung des Isoprostane im Urin, nicht jedoch im Plasma. Auch konnten in weiteren Studien erhöhte

Konzentrationen von MDA bei Diabetes mellitus gefunden werden<sup>57,122</sup>. Eine Korrelation wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht.

In Zusammenschau liegt in meiner Arbeit für die beiden Parameter in der Mehrzahl der Populationen keine signifikante Korrelation vor. Daher stellen diese Beobachtungen einen kausalen Zusammenhang zwischen F<sub>2</sub>-Isoprostanen bzw. MDA mit der Ausprägung der Diabetes-Symptomatik in Frage.

### Antioxidantientherapie

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die Bildung der F<sub>2</sub>-Isoprostane durch freie Radikale vermittelt ist, führten wir eine weitere Versuchsreihe unter der Gabe des Antioxidans Tempol durch. Damit sollte die Bildung freier Radikale frühzeitig unterbunden und somit oxidativer Stress vorzeitig reduziert werden. Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) ist eine in seinen Eigenschaften der Superoxiddismutase (SOD) ähnliche Substanz. Der Unterschied liegt aufgrund seines geringen molekularen Gewichts in der Membranpermeabilität. Tempol entfaltet seine Wirkung daher auch intrazellulär und kann so dem intrazellulären oxidativen Stress entgegenwirken, indem es die Menge an Hydroxylradikalen vermindert<sup>15,16</sup>.

Die Gabe von Tempol führte meinen Beobachtungen zu Folge zu einer Verminderung der Konzentrationen an F<sub>2</sub>-Isoprostanen und MDA. Das Konzentrationsniveau einer gesunden Maus wurde allerdings nicht erreicht. Insoweit konnte ich trotz Supprimierung der Redoxmarker weder eine Verminderung der Blutglukose noch der Diurese oder der Proteinurie durch Tempolgabe erzielen. Kürzlich beobachteten Banday et al.<sup>3</sup> einen positiven Effekt von Tempol bei „zucker diabetes fatty“-Ratten. Hierbei konnte die Insulinsensitivität verbessert und der Blutzucker gesenkt werden. Nach einer anderen Studie hatte die Zugabe von Tempol demgegenüber nur eine geringe signifikante Reduktion der Konzentration der F<sub>2</sub>-Isoprostane zur Folge<sup>79</sup>.

Zu der Fragestellung der zuletzt beschriebenen Untersuchungsreihe erfolgten bereits mehrere klinische Studien mit den antioxidativ wirksamen Vitaminen E und C (wie bereits auf Seite 54 aufgeführt). In mehreren der betreffenden Studien konnten jedoch hinsichtlich Vitamin C (3x500 mg/d bzw. 2x500 mg/d, mind. 3 Wochen) und Vitamin E (100 IU/d bzw. 800 IU/d, mind. 3 Wochen) keine signifikanten Reduktionen der gemessenen Redoxmarker nachgewiesen werden<sup>22,58,63</sup>. Aber auch positive Effekte sind belegt. Durch eine zusätzliche Antioxidantientherapie, zum Beispiel durch Vitamin-E-Supplementierung, kam es zur Verminderung des MDA bei Typ 1 Diabetikern<sup>58</sup>. Entsprechendes gilt für das Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein<sup>63</sup>. Für diese Substanz wurde eine Verbesserung der Insulinsekretion und eine Steigerung der Transkription der Insulin-mRNA nachgewiesen. N-Acetyl-L-Cystein wird zusätzlich ein Erhalt der  $\beta$ -Zellfunktion zugesprochen.

Neben diesen genannten Antioxidantien führte die Gabe von Raxofelast® (2x600 mg/d für 1 Woche)<sup>7</sup>, einem hydrophilen Vitamin E, und von α-Liponsäure® (α-LPA) (600 mg/d, mindestens 3 Monate)<sup>12</sup> zu einer günstigen Beeinflussung der Imbalance zwischen oxidativem Stress und antioxidativem System.

Ergänzend ist darüber hinaus auf die CHAOS-Studie und die HOPE-Studie hinzuweisen. Bei beiden Studien handelt es sich um groß angelegte Untersuchungen, welche für die Therapie mit Vitamin E zu widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich des klinischen Benefit kommen<sup>93</sup> (siehe Seite 55).

Die kontroversen Ergebnisse der vorliegenden Studien belegen, dass im Hinblick auf die Wirkung von Antioxidantien weiterhin Unklarheiten bestehen. Zwar kommt es unter Tempolgabe zu einer Reduktion des Markers von oxidativem Stress, den F2-Isoprostanen, allerdings ist offen, inwieweit durch die Gabe von Antioxidantien die an den Organen durch fortbestehende unveränderte Hyperglycämie verursachten Schäden – beispielsweise Proteinurie als Ausdruck der Nierenschädigung - unterbunden werden können. Möglicherweise haben die jeweilige Wirkdauer und Dosis der entsprechenden Antioxidantien einen wesentlichen Einfluss auf eventuelle Therapieerfolge.

## V. Zusammenfassung

Diabetes mellitus gewinnt aufgrund steigender Fallzahlen und der dadurch bedingten Zunahme der Komplikationen, die durch die Erkrankung hervorgerufen werden, immer mehr an Bedeutung. Als ein möglicher Faktor für die Entstehung der Erkrankung und Folgeschäden wird oxidativer Stress diskutiert. Im Rahmen von oxidativem Stress verursachen freie Radikale Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA. Insofern wäre ein valider Marker zur Erfassung dieser Veränderungen wünschenswert. Ein bereits angewandter Parameter für die Lipidoxidation ist das MDA, das aus dem Patientenserum bestimmt wird. Daneben werden in den letzten Jahren aus dem Urin bestimmte  $F_2$ -Isoprostane als zuverlässiger Marker für oxidativen Stress postuliert.

Die vorliegende Arbeit besteht aus einem klinischen und einem tierexperimentellen Teil. Zunächst wurden Untersuchungen an Kindern mit Typ 1 Diabetes durchgeführt. Anschließend erfolgten ergänzend Untersuchungen an verschiedenen Mauspopulationen. Analysiert wurden dabei relevante Laborparameter wie Blutzucker,  $HbA_{1c}$ ,  $F_2$ -Isoprostane, 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  und MDA.

Die klinische Studie zeigt, dass sowohl MDA als auch die  $F_2$ -Isoprostane bei an Diabetes mellitus erkrankten Kindern im Vergleich zu einer gesunden Population erhöht sind. Es kann lediglich für die  $F_2$ -Isoprostane eine signifikante Korrelation zum  $HbA_{1c}$  gefunden werden. Eine Korrelation zum aktuellen Blutzucker kann dagegen weder für die  $F_2$ -Isoprostane noch für das 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  beobachtet werden. Auch zwischen den  $F_2$ -Isoprostanen und dem MDA ist kein Zusammenhang nachweisbar. Auf der Basis dieser Beobachtung scheint es fraglich, ob  $F_2$ -Isoprostane als verlässlicher Verlaufsparemeter bei Typ 1 Diabetikern dienen kann.

Im Tiermodell bestätigen sich diese Ergebnisse. Zu beobachten ist eine Erhöhung der Konzentration der  $F_2$ -Isoprostane, die mit der Dauer der Erkrankung zunimmt. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse ist daher zu diskutieren, ob es sich bei der erhöhten Konzentration der  $F_2$ -Isoprostane (nur) um ein Epiphänomen bei Diabetes mellitus handelt. Es scheint allerdings einen Zusammenhang der Isoprostane mit der Güte der Blutzuckereinstellung zu geben.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen, dass das Fehlen des Isoenzym COX-1 keinen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung hat. Auch ein Einfluss auf die Bildung der  $F_2$ -Isoprostane ist nicht nachweisbar. Dagegen ist bei einem Fehlen des Isoenzym COX-2 ein vorzeitiges Versterben der Tiere zu beobachten, mutmaßlich verursacht durch eine erhöhte Toxizität des Streptozotocins, wobei der konkrete Mechanismus nicht sicher geklärt ist. Es kommt jedenfalls zu einem massiven Blutzuckeranstieg. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass das vorzeitige Versterben der COX-2 $^{-/-}$ -Mäuse und der Wildtypmäuse, welche mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC236) behandelt wurden, nicht genetisch bedingt ist. Der Grund dürf-

te vielmehr in einer erhöhten Sensibilität des Pankreas für das applizierte Streptozotizin infolge des fehlenden Isoenzym COX-2 liegen.

Des Weiteren deuten die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass das Isoenzym COX-2 bei der Bildung des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> eine wesentliche Rolle spielt. Weitere F<sub>2</sub>-Isoprostane entstehen auf einem durch freie Radikale vermittelten Weg. Bei einer möglichen Anwendung der F<sub>2</sub>-Isoprostane als Parameter für oxidativen Stress ist daher zu bedenken, dass es bei der Bestimmung des 8-epi-PGF<sub>2α</sub> zu einer Beeinflussung durch COX-Inhibitoren (zum Beispiel Aspirin®) kommen kann.

Da die Bildung der meisten F<sub>2</sub>-Isoprostane radikal-vermittelt stattfindet, sind Radikalfänger gegebenenfalls als mögliche Therapieergänzung einsetzbar. Unter der Gabe von Tempol kommt es zu einer Verminderung der Lipidoxidation (MDA, F<sub>2</sub>-Isoprostane), allerdings ohne Besserung der klinischen Parameter, insbesondere des Blutzuckers, der Diurese und der Proteinurie. Therapieoptionen mittels Antioxidantien sollten insofern weiter diskutiert werden, da zum aktuellen Zeitpunkt die Datenlage kontrovers ist.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass oxidativer Stress wahrscheinlich an der Pathogenese des Diabetes mellitus und der entsprechenden Komplikationen beteiligt ist. Zwar zeigt sich im Tierversuch eine Korrelation zwischen der Dauer der Erkrankung und der Konzentration der F<sub>2</sub>-Isoprostane, allerdings bei fehlender Behandlung der Hyperglycämie. Beim Menschen ist ein entsprechender Zusammenhang infolge der Therapie erheblich schwerer festzustellen. Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind die F<sub>2</sub>-Isoprostane zudem bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen und auch bei Rauchern erhöht. Daher verbleiben vernünftige Zweifel, ob die F<sub>2</sub>-Isoprostane als Marker für oxidativen Stress bei Diabetes mellitus tatsächlich aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich des Erkrankungsausmaßes liefern.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Andersen JK. Oxidative Stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004;10 Suppl:S18-S25.
2. Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F<sub>2</sub>-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J Biol Chem* 1993;268:4161-4169.
3. Banday AA, Marwaha A, Tallam LS, Lokhandwala MF. Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D<sub>1</sub> receptor hyperphosphorylation, and restores D<sub>1</sub> receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes* 2005;54:2219-2226.
4. Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF<sub>2</sub> alpha, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol* 1992;263:H660-H663.
5. Basu S. Radioimmunoassay of 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha: an index for oxidative injury via free radical catalysed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998;58:319-325.
6. Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2004;38:105-122.
7. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-412.
8. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48:1-9.
9. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF, Jr., Creager MA. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285: H2392-H2398.

10. Bondesen BA, Mills ST, Pavlath GK. The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C1651-C1659.
11. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 2008;23:381-390.
12. Borcea V, Nourooz-Zadeh J, Wolff SP, Klevesath M, Hofmann M, Urich H, Wahl P, Ziegler R, Tritschler H, Halliwell B, Nawroth PP. alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1495-1500.
13. Brown ED, Morris VC, Rhodes DG, Sinha R, Levander OA. Urinary malondialdehyde-equivalents during ingestion of meat cooked at high or low temperatures. *Lipids* 1995;30:1053-1056.
14. Chalmers A. Smoking and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 1999;69:572.
15. Charloux C, Paul M, Loisançe D, Astier A. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radic Biol Med* 1995;19:699-704.
16. Chen YF, Cowley AW, Jr., Zou AP. Increased H(2)O(2) counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R827-R833.
17. Chowienzyk PJ, Brett SE, Gopaul NK, Meeking D, Marchetti M, Russell-Jones DL, Anggard EE, Ritter JM. Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. *Diabetologia* 2000;43:974-977.
18. Classen, Diel, Kochsiek: *Innere Medizin*; 5. Auflage.
19. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009 Apr 16;360(16):1646-54.

20. Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res* 2001;38:93-103.
21. Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:360-366.
22. Darko D, Dornhorst A, Kelly FJ, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:339-344.
23. Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Basili S, Ciabattini G, Patrono C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 2003;107:3199-3203.
24. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-229.
25. Davi G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:256-268.
26. Deutsche Diabetes-Union. Gesundheitsbericht Diabetes 2007
27. diabetesDE. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2010.
28. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995;378:406-409.
29. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes*



- Care 1998;21:1736-1742.
30. Draper HH, Polensek L, Hadley M, McGirr LG. Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. *Lipids* 1984;19:836-843.
  31. Elmhurst JL, Betti PA, Rangachari PK. Intestinal effects of isoprostanes: evidence for the involvement of prostanoid EP and TP receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1198-1205.
  32. Favreau F, Petit-Paris I, Hauet T, Dutheil D, Papet Y, Mauco G, Tallineau C. Cyclooxygenase 1-dependent production of  $F_2$ -isoprostane and changes in redox status during warm renal ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004;36(8):1034-42.
  33. Feillet-Coudray C, Choné F, Michel F, Rock E, Thiéblot P, Rayssiguier Y, Tauveron I, Mazur A. Divergence in plasmatic and urinary isoprostane levels in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2002;324(1-2):25-30.
  34. Flores L, Rodela S, Abian J, Claria J, Esmatjes E.  $F_2$  isoprostane is already increased at the onset of type 1 diabetes mellitus: effect of glycemic control. *Metabolism* 2004;53:1118-1120.
  35. Fujita H, Kakei M, Fujishima H, Morii T, Yamada Y, Qi Z, Breyer MD. Effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor treatment on glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:37-43.
  36. Fujita Y, Mori I, Kitona S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku* 1983;32:E379-386.
  37. Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF. Evidence for the existence of  $F_2$ -isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993;264:C1619-C1624.
  38. Fukunaga M, Takahashi K, Badr KF. Vascular smooth muscle actions and recep-

- tor interactions of 8-iso-prostaglandin E<sub>2</sub>, an E<sub>2</sub>-isoprostane. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:507-515.
39. Gariboldi MB, Rimoldi V, Supino R, Favini E, Monti E. The nitroxide tempol induces oxidative stress, p21 (WAF1/CIP1), and cell death in HL60 cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29:633-641.
40. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-267.
41. Gleisner A, Martinez L, Pino R, Rojas IG, Martinez A, Asenjo S, Rudolph MI. Oxidative stress markers in plasma and urine of prepubertal patients with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:995-1000.
42. Gonzalez E, Rosello-Catafau J, Jawerbaum A, Vela J, Sinner D, Pustovrh C, White V, Xaus C, Peralta C, Gimeno MA. Involvement of inducible isoforms of COX and NOS in streptozotocin-pancreatic damage in the rat: interactions between nitridergic and prostanoid pathway. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;64:311-316.
43. Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A, Kawamori D, Yasuda T, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Probucol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;57:1-10.
44. Gross G, Imamura T, Vogt SK, Wozniak DF, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278: R1415-R1423.
45. Gunnnett CA, Heistad DD, Faraci FM. Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke* 2003;34:2970-2974.
46. Haak ES, Usadel KH, Kohleisen M, Yilmaz A, Kusterer K, Haak T. The effect of alpha-lipoic acid on the neurovascular reflex arc in patients with diabetic

- neuropathy assessed by capillary microscopy. *Microvasc Res* 1999;58:28-34.
47. Hata I, Kaji M, Hirano S, Shigematsu Y, Tsukahara H, Mayumi M. Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr Int* 2006;48:58-61.
48. Heistad DD. Oxidative stress und vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:689-695.
49. Heitmeier MR, Kelly CB, Ensor NJ, Gibson KA, Mullis KG, Corbett JA, Maziasz TJ. Role of cyclooxygenase-2 in cytokine-induced beta-cell dysfunction and damage by isolated rat and human islets. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53145-51.
50. Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Warehime SS, Van Dyke K, Hobbs G. Oxidative stress and insulin requirements in patients with recent-onset type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1624-1628.
51. Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke* 1997;28:844-849.
52. Hotta N. New approaches for treatment in diabetes: aldose reductase inhibitors. *Biomed Pharmacother* 1995;49:232-243.
53. Hsu PY, Tsai AL, Kulmacz RJ, Wang LH. Expression, purification and spectroscopic characterization of human thromboxane synthase. *Biochem J* 1999; 274:762-769.
54. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988;256:205-212.
55. International diabetes federation. *Diabetes Atlas*, 3rd Edition. 2006

- 
56. Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 1998;76:21-31.
  57. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-1543.
  58. Jain SK, McVie R, Smith T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* 2000;23:1389-1394.
  59. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy* 2000;101:541-551.
  60. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1067-L1082.
  61. Jourdan KB, Mitchell JA, Evans TW. Release of isoprostanes by human pulmonary artery in organ culture: a cyclooxygenase and nitric oxide dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:668-672.
  62. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, FitzGerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plataras J, Roberts LJ, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radic Biol Med* 2005;38:698-710.
  63. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999;48:2398-2406.
  64. Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH, Banerjee M. Airway and vas-

- cular effects of 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* 1993;74:460-465.
65. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T-cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993;74:1089-1100.
66. Kauffman LD, Sokol RJ, Jones RH, Awad JA, Rewers MJ, Norris JM. Urinary F<sub>2</sub>-Isoprostanes in young healthy children at risk for type 1 diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* 2003;35:551-557.
67. Kaufman DL, Tobin AJ. Glutamate decarboxylases and autoimmunity in insulin-dependent diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:107-109.
68. Kellerer M, Danne T. Praxisleitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2009; 4:113-114.
69. Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes* 2007;56:2997-3005.
70. Klein T, Neuhaus K, Reutter F, Nüsing RM. Generation of 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2001;133(5):643-50.
71. Klein T, Reutter F, Schweer H, Seyberth HW, Nüsing RM. Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1658-65.
72. Kolb H. Kuhmilch und Diabetes. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2001;149(13): S62-S65.
73. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev*. 1987;3(3):751-78.

74. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol-ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991;266:12866-12872.
75. Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap KA. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res* 2005;75:71-80.
76. Lahaie I, Hardy P, Hou X, Hassessian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts LJ, Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F<sub>2</sub> alpha on retinal vessels. *Am J Physiol* 1998;274:R1406-R1416.
77. Lee JY, Kim MJ, Moon CK, Chung JH. Degradation products of streptozotocin do not induce hyperglycemia in rats. *Biochem Pharmacol* 1993;46:2111-2113.
78. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 1996;20:463-466.
79. Li J, Chen YJ, Quilley J. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:818-824.
80. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976;193:415-417.
81. Lin B, Zhang ZL, Yu LY, Guo LH. CMV-hFasL transgenic mice are sensitive to low doses of streptozotocin-induced type I diabetes mellitus. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:1199-1204.
82. Löffler, Petrides; *Biochemie & Pathobiochemie*; 7. Auflage; Springer. Horn, Lindenweier; *Biochemie des Menschen*; 2.Auflage; Thieme.

83. Longmire AW, Roberts LJ, Morrow JD. Actions of the Es-Isoprostane, 8-ISO-PGE<sub>2</sub>, on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor. *Prostaglandins* 1994;48:247-256.
84. Luo P, Wang MH. Eicosanoids,  $\beta$ -cell function, and diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011;95:1-10.
85. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29:1-13.
86. Marienfeld S, Hummel S, Ziegler AG, Hummel M: Frühkindliche Ernährung und Typ 1 Diabetes. *Dtsch Arztebl* 2007;104:A570-575.
87. Maritim AC, Sander RA, Watkins JB, III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
88. Markesbery WR. Oxidative Stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 1997;23:134-147.
89. Marre M. Genetics and the prediction of complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22 Suppl 2:B53-B58.
90. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Estimation of lipoperoxidative damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants. *Free Radic Res* 2005;39:933-942.
91. Matsuoka T, Kajimoto Y, Watada H, Kaneto H, Kishimoto M, Umayahara Y, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y. Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest* 1997;99:144-150.
92. Matteucci E, Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients: further evidence. *Diabetes Care* 2001;24:167-168.
93. Mezzetti A, Cipollone F, Cuccurullo F. Oxidative stress and cardiovascular com-

- plications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res* 2000;47:475-488.
94. Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of  $F_2$ -isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nat Protoc* 2007;2:221-226.
95. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295:1681-1687.
96. Montero A, Munger KA, Khan RZ, Valdivielso JM, Morrow JD, Guasch A, Ziyadeh FN, Badr KF.  $F(2)$ -isoprostanes mediate high glucose-induced TGF-beta synthesis and glomerular proteinuria in experimental type I diabetes. *Kidney Int.* 2000;58(5):1963-72.
97. Moran A, Zhang HJ, Olson LK, Harmon JS, Poitout V, Robertson RP. Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15. *J Clin Invest* 1997;99:534-539.
98. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O. Prostaglandin-synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995;83:473-482.
99. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids ( $F_2$ -isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10721-10725.
100. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin  $F_2$ -like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9383-9387.
101. Morrow JD, Minton TA, Badr KF, Roberts LJ. Evidence that the  $F_2$ -isoprostane,



- 8-epi-prostaglandin  $F_2$  alpha, is formed in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1994;1210:244-248.
102. Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, Badr KF, Blair IA, Roberts LJ. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 1994;269:4317-4326.
103. Morrow JD, Zackert WE, Yang JP, Kurhts EH, Callewaert D, Dworski R, Kanai K, Taber D, Moore K, Oates JA, Roberts LJ. Quantification of the major urinary metabolite of 15- $F_2$ t-isoprostane (8-iso-PGF $_2$ alpha) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal Biochem* 1999;269:326-331.
104. Musiek ES, Yin H, Milne GL, Morrow JD. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* 2005;40:987-994.
105. Myers MA, Laks MR, Feeney SJ, Mandel TE, Koulmanda M, Bone A, Barley J, Rowley MJ, Mackay IR. Antibodies to ICA512/IA-2 in rodent models of IDDM. *J Autoimmun* 1998;11:265-272.
106. Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. *Singapore Med J* 2010; 51(7) : 582.
107. Nakhlooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 1977;26:100-112.
108. Nasrallah R, Landry A, Singh S, Sklepowicz M, Hebert RL. Increased expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the diabetic rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F1068-F1077.
109. Natarajan R, Lanting L, Gonzales N, Nadler J. Formation of an  $F_2$ -isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am*

- J Physiol. 1996;271(1 Pt 2):H159-65.
110. Nugteren DH. The determination of prostaglandin metabolites in human urine. J Biol Chem 1975;250:2808-2812.
  111. Ohashi N, Yoshikawa M. Rapid and sensitive quantification of 8-isoprostaglandin F<sub>2</sub>alpha in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000;746:17-24.
  112. Olliges A, Wimmer S, Nüsing RM. Defects in mouse nephrogenesis induced by selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Br J Pharmacol 2011;163:927-936
  113. Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. J Clin Invest 1993;92:514-519.
  114. Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CV, Towle HC, Robertson RP, Stein R. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:9127-9131.
  115. Patrignani P, Panara MR, Tacconelli S, Seta F, Bucciarelli T, Ciabattoni G, Alessandrini P, Mezzetti A, Santini G, Sciulli MG, Cipollone F, Davi G, Gallina P, Bon GB, Patrono C. Effects of vitamin E supplementation on F(2)-isoprostane and thromboxane biosynthesis in healthy cigarette smokers. Circulation 2000;102:539-545.
  116. Pfeiffer A, Schatz H. Diabetic microvascular complications and growth factors. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1995;103:7-14.
  117. Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction.

---

Hypertension 1998;31:1047-1060.

118. Pratico D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999;147:1-10.
119. Pratico D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang SW, Khanapure SP, Iuliano L, Rokach J, FitzGerald GA. IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3449-3454.
120. Pratico D, FitzGerald GA. Generation of 8-epiprostaglandin F<sub>2</sub>alpha by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem* 1996;271:8919-8924.
121. Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *J Biol Chem* 1995;270:9800-9808.
122. Rajeswari P, Natarajan R, Nadler JL, Kumar D, Kalra VK. Glucose induces lipid-peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* 1991;149:100-109.
123. Ramakrishna V, Jailkhani R. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. *Diagn Pathol* 2007;2:22.
124. Rashidi A, Nakhjavani M, Esteghamati A, Asgarani F, Khalilzadeh O, Abbasi M, Safari R. Association between oxidant/antioxidant markers and proteinuria in type 2 diabetes: results in 142 patients. *J Nephrol.* 2009;22(6):733-8.
125. Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Metairon S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett* 1999;459:259-262.
126. Robertson RP. Type II diabetes, glucose "non-sense," and islet desensitization. *Diabetes* 1989;38:1501-1505.

- 
127. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003;52:581-587.
  128. Robertson RP, Harmon JS. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 2006;41:177-184.
  129. Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 1992;90:320-325.
  130. Robertson RP. Dominance of cyclooxygenase-2 in the regulation of pancreatic islet prostaglandin synthesis. *Diabetes*. 1998;47(9):1379-83.
  131. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* 1997;54:853-873.
  132. Rösen P, Bellin C. Diabetes und oxidativer Stress. *Blickpunkt der Mann* 2004; 2(3), 23-30.
  133. Rytter E, Vessby B, Asgard R, Johansson C, Sjödin A, Abramsson-Zetterberg L, Möller L, Basu S. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 diabetes subjects. *Br J Nutr*. 2009; 101(10):1423-6.
  134. Sametz W, Hennerbichler S, Glaser S, Wintersteiger R, Juan H. Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE(2) and 8-iso-PGF(2alpha), in some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol*. 2000;130(8):1903-10.
  135. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ. Plasma F<sub>2</sub> isoprostanes: direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:537-541.
  136. Schatz H. *Diabetologie kompakt*, 4. Auflage 2006

- 
137. Schweer H, Watzer B, Seyberth HW. Determination of seven prostanoids in 1 ml of urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr* 1994;652:221-227.
  138. Schweer H, Watzer B, Seyberth HW, Nusing RM. Improved quantification of 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and F<sub>2</sub>-isoprostanes by gas chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry: partial cyclooxygenase-dependent formation of 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in humans. *J Mass Spectrom* 1997;32:1362-1370.
  139. Sharma A, Olson LK, Robertson RP, Stein R. The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 1995;9:1127-1134.
  140. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56:387-437.
  141. Sinclair AJ, Girling AJ, Gray L, Lunec J, Barnett AH. An investigation of the relationship between free radical activity and vitamin C metabolism in elderly diabetic subjects with retinopathy. *Gerontology* 1992;38:268-274.
  142. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006;13:129-142.
  143. Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 1991;49:153-179.
  144. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-546.
  145. Taylor AW, Bruno RS, Frei B, Traber MG. Benefits of prolonged gradient separation for high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of plasma total 15-series F-isoprostanes. *Anal Biochem* 2006;350:41-51.

- 
146. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986.
147. Thomas TP, Porcellati F, Kato K, Stevens MJ, Sherman WR, Greene DA. Effects of glucose on sorbitol pathway activation, cellular redox, and metabolism of myo-inositol, phosphoinositide, and diacylglycerol in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Clin Invest* 1994;93:2718-2724.
148. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-853.
149. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Antioxidant vitamins C and E ameliorate hyperglycaemia-induced oxidative stress in coronary endothelial cells. *Diabetes Obes Metab* 2004;6:442-451.
150. Unger RH, Grundy S. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 1985;28:119-121.
151. Vennemann A, Gerstner A, Kern N, Ferreiros Bouzas N, Narumiya S, Maruyama T, Nüsing RM. PTGS-2-PTGER2/4 Signaling Pathway Partially Protects From Diabetogenic Toxicity of Streptozotocin in Mice. *Diabetes*. 2012;61(7): 1879-87.
152. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994;70:138-151.
153. Wang Z, Ciabattini G, Creminon C, Lawson J, FitzGerald GA, Patrono C, MacIouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:94-100.

- 
154. Wegmann DR, Norbury-Glaser M, Daniel D. Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur J Immunol* 1994;24:1853-1857.
  155. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE, Garg ML. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary or metabolic factors. *J AM Coll Nutr* 2001;20:157-165.
  156. World health organisation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. 2006
  157. Wruck LG, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chen K, Hassenpflug J, Freitag-Wolf S, Varoga D, Lipross S, Pufe T. Extended report: role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis* 2011;10:844-850.
  158. Yang RL, Shi YH, Hoa G, Li W, Le GW. Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyd and athero-genetic index. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43:154-158.151.

## VII. Anhang

### VII.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Dr. Adamkiewicz, Prof. Dr. Aumüller, Prof. Dr. Barth, Dr. Basler, Dr. Baum, Dr. Becker, Prof. Dr. Cetin, PD Dr. Christiansen, Prof. Dr. Cubayko, Prof. Dr. Daut, Dr. Duda, Prof. Dr. Eilers, Dr. Feusser, Prof. Dr. Fuchs-Winkelmann, PD Dr. Gerdes, Dr. Geuss, Prof. Dr. Gotzen, Dr. Griss, Prof. Dr. Görg, Dr. Görg, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Hasilik, Prof. Dr. Hertel, Dr. Herzum, Dr. Hofmann, Dr. Jungclas, Dr. Klenk, Prof. Dr. Klose, Prof. Dr. Kohlmann, Dr. Krieg, Dr. Kroll, PD Dr. Kuhlmann, Dr. Lang, Prof. Dr. Lill, Prof. Dr. Löffler, Prof. Dr. Maier, Dr. Mandrek, Prof. Dr. Maisch, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Dr. Müller, Dr. Mutters, Dr. Oertel, Dr. Remschmidt, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Rothmund, Dr. Schäfer, Dr. Schmidt, Dr. Schneyer, Dr. Schnabel, Prof. Dr. Seitz, Dr. Studer, Prof. Dr. Surske, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Wulf.

### VII.2. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. R. Nüsing, Pharmakologisches Institut in Frankfurt, und Dr. A. Leonhardt, Medizinisches Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin Marburg, für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Besonderer Dank gilt neben den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Prostaglandinlabors unter der Leitung von B. Watzel und Dr. H. Schweer, die freundlicherweise die Bestimmung der Prostaglandine und ihrer Derivate durchgeführt haben, auch dem Leiter der Normwertstudie Dr. Reinalter für die Bereitstellung der Proben für die Referenzwerte für die Prostaglandinbestimmung für den klinischen Teil meiner Doktorarbeit.

Außerdem bedanke ich mich beim ganzen Team des Labors für molekulare und experimentelle Pharmakologie für die Einarbeitung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, Geschwistern und meinem Freund gebührt Dank für ihre in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an meine Schwester für die graphische Überarbeitung der Arbeit.